ASPEKTE DES ENERGIEGEWINNS DURCH SUBSTRATPHOSPHORYLIERUNG IM ZUGE DER SULFITOXIDATION BEI CHROMATIACEAE UND THIOBACILLUS DENITRIFICANS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

HORST ULBRICHT
aus
ESSEN

BONN 1984

Diss Bonn
1984

ASPEKTE DES ENERGIEGEWINNS DURCH SUBSTRATPHOSPHORYLIERUNG IM ZUGE DER SULFITOXIDATION BEI CHROMATIACEAE UND THIOBACILLUS DENITRIFICANS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

HORST ULBRICHT

aus

ESSEN

BONN 1984

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Mikrobiologie durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. H.G. Trüper
Korreferent: Prof. Dr. M. Höfer

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juni 1984

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	Einleitung	15
II	Material und Methoden	21
1	Mikrobiologische Methoden	21
1.1	Organismen	21
1.2	Nährmedien	21
1.2.1	Nährmedien für Thiobacillus denitrificans RT	21
1.2.2	Nährmedium für kleine Chromatiaceae	22
1.2.3	Nährmedium für Chromatium warmingii	24
1.2.4	Nährmedium für Desulfurikanten	25
1.2.5	Anlegen von Agar-Schüttelkulturen	26
1.3	Prüfung auf Reinheit der Kulturen	26
1.4	Sauerstoffabsorptionsmittel	27
1.5	Messung des Bakterienwachstums	27
1.5.1	Trübungsmessung	27
1.5.2	Bestimmung des Proteingehaltes	27
1.6	Wachstumsversuche	28
1.7	Zellernte	28
2	Enzymatischer Nachweis verschiedener Adenylate	29
2.1	Nachweis für ATP, APS und PAPS	29
2.2	Enzymatischer ADP - Nachweis	30
2.3	Dünnschichtchromatographischer Nachweis verschiedener Adenylate	31
3	Enzymologische Methoden	32
3.1	Herstellung zellfreier Extrakte	32
3.2	Enzymatische Nachweismethoden	33
3.2.1	ATP - Sulfurylase	33
3.2.2	ADP - Sulfurylase	34
3.2.3	Adenylatkinase	35
3.2.4	Pyrophosphatase	36
3.2.4.1	Phosphatnachweis	36
3.2.5	APS - Kinase	37
3.2.5.1	Qualitativer Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie	37

		Seite
3.2.6	APS - Reduktase	37
3.2.6.1	Qualitativer Nachweis der APS - Reduktase mittels Dünnschichtchromatographie	37
3.2.6.2	Ferricyanid - gekoppelter Test	38
3.2.6.3	APS - Reduktasetest mit Cytochrom c als Elektronenakzeptor	39
3.2.7	Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase	39
4	Anreicherungsverfahren	40
4.1	Hitzefällung	40
4.2	Ammoniumsulfatfällung nach Warburg und Christian (1941)	40
4.3	Ultrafiltration	41
4.4	Säulenchromatographische Methoden	41
4.4.1	Gelfiltration mit Sephadex G 25, G 75, G 200 und Sephadex S 300	41
4.4.2	Ionenaustauschchromatographie	44
4.4.3	Affinitätschromatographie	43
4.5	Disc-Gelelektrophorese nach Maurer (1971)	45
4.6	Nachweis der APS - Reduktase im Gel	46
4.7	Analytische Elektrofokussierung im Gel	46
5	Sonstige Methoden	47
5.1	Proteinbestimmung von löslichen Extrakten	47
5.2	Ionenleitfähigkeitsmessung	48
5.3	Aufnahme der Spektren	48
5.4	Identifizierung der Cytochrome	48
5.5	Aufnahme eines alkalischen Pyridinspektrums	48
5.6	Bestimmung des Redoxpotentials	49
5.7	Synthese von Adenosin - 5' - Phosphosulfat	50
6	Herkunft der Chemikalien	52
III	Experimente und Ergebnisse	53

Orientierende Vorversuche über das Vorkommen und die Lokalisation von APS - Reduktase und aller weiteren Enzyme, die an der Energiegewinnung durch

		Seite
	Substratphosphorylierung beteiligt sein könnten	53
1.1	Enzymatischer Nachweis der Enzyme	53
2	Wachstumsversuche	55
2.1	Auswertung der Wachstumsversuche bei Thiobacillus denitrificans	56
2.2	Auswertung der Wachstumsversuche bei Chromatium warmingii	58
2.3	Auswertung der Wachstumsversuche bei Chromatium vinosum	59
2.4	Auswertung der Wachstumsexperimente bei Chromatium gracile	60
2.5	Auswertung der Wachstumsergebnisse bei C.purpuratum und C.minutissimum	61
2.6	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Wachstumsexperimenten	62
3	Isolierung von Cytochromen aus C.gracile	63
3.1	Präparative Vorbereitung zur Isolierung der Cytochrome	63
3.2	Trennung der löslichen Proteine durch Ionenaustauschchromatographie	64
3.3	Anreicherung,Identifizierung und Charakterisierung von Cytochrom c_{553}	66
3.3.1	Ammoniumsulfatfällung	66
3.3.2	Gelfiltration an einer Sephadex G 75 - Säule	66
3.3.3	Elektrophoretische Reinheitskontrolle	67
3.3.4	Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sephadex G 75 und Sephacryl S 200	67
3.3.5	Aufnahme des Absorptionsspektrums	68
3.3.6	Aufnahme eines alkalischen Pyridinspektrums	69
3.3.7	Gehalt an Cytochrom c_{553} pro 1 000 g Zellnaßgewicht	69
3.3.8	Bestimmung des Redoxpotentials	69
3.4.1	Anreicherung, Identifizierung und Charakterisierung des Flavocytochroms aus C.gracile	70
3.4.2	Elektrophoretische Reinheitskontrolle	71
3.4.3	Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sephadex G 75 und Sephacryl S 200	71
3.4.4	Aufnahme des Absorptionsspektrums	72
3.4.5	Flavocytochromgehalt pro 1 000 g Zellen (Naßgewicht)	73
3.4.6	Bestimmung des Redoxpotentials	73

		Seite
3.5.1	Anreicherung, Identifizierung und Charakterisierung des Cytochrom c' aus C.gracile	74
3.5.2	Elektrophoretische Reinheitskontrolle	75
3.5.3	Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration	75
3.5.4	Aufnahme des Absorptionsspektrums	75
3.5.5	Bestimmung des Redoxpotentials	76
3.5.6	Cytochrom c'-Gehalt pro 1 000 g Zellmaterial (Naßgewicht)	77
4	Die APS - Reduktasen	77
4.1	Versuche zur Solubilisierung der chromatophorengebundenen APS - Reduktase	77
4.1.2	Chemische Methoden	78
4.1.2.1	Beeinflussung durch Ionen	78
4.1.2.2	Die Beeinflussung durch Solventien und Detergenzien	79
4.2	Anreicherung der APS - Reduktase aus Chromatium vinosum	80
4.3	Charakterisierung der partiell gereinigten APS - Reduktase	81
4.3.1	Testbedürfnisse und Substratspezifität	81
4.3.2	Einfluß des pH - Wertes auf die Aktivität der APS - Reduktase	83
4.3.3	Temperaturoptimum der APS - Reduktase	83
4.3.4	Haltbarkeit der APS - Reduktase	84
4.3.5	Molekulargewicht der APS - Reduktase	86
4.3.6	Spektrale Untersuchungen der APS - Reduktase	86
4.3.7	Aussagen zur Reinheit des Präparates	87
4.3.8	Nukleotidspezifität	87
4.3.9	Hemmstoffversuche	88
4.3.10	Kinetische Untersuchungen	91
5.	Die ATP - Sulfurylasen aus T.denitrificans und C.warmingii	92
5.1	Anreicherung der ATP - Sulfurylase	92
5.1.1	Herstellung des zellfreien Extraktes	92
5.1.2	Ionenaustauschchromatographie	94
5.1.3	Ammoniumsulfatfällung	94
5.1.4	Gelfiltration	95

		Seite
5.2	Charakterisierung der ATP - Sulfurylasen aus T.denitrificans und C.warmingii	96
5.2.1	Stöchiometrie der ATP - Sulfurylasereaktion	96
5.2.2	pH - Optima der ATP - Sulfurylasen	96
5.2.3	Temperaturoptima	97
5.2.5	Substratsättigungskurven für APS und PP_i	99
5.2.6	Bestimmung des Molekulargewichtes	103
6	Eigenschaften der untersuchten ADP - Sulfurylasen	104
6.1	Anreicherung der ADP - Sulfurylase aus Chromatium warmingii	104
6.1.1	Herstellung des zellfreien Extraktes	104
6.1.2	Anionenaustauschchromatographie	104
6.1.3	Gelfiltration	104
6.1.4	Anionenaustauschchromatographie II	105
6.2	Aussagen zur Reinheit des gewonnenen Präparates	105
6.3	Charakterisierung der ADP - Sulfurylasen	105
6.3.1	Einfluß von Molarität und pH - Wert des Tris - HCl Puffers auf die Aktivität der ADP - Sulfurylasen	105
6.3.2	Temperaturoptima	106
6.3.3	Stöchiometrie der ADP - Sulfurylasereaktion	108
6.3.4	Molekulargewichtsbestimmung	110
6.3.5	Lagerungsfähigkeit der gereinigten ADP - Sulfurylasen	111
6.3.6	Aufnahme der Substratsättigungskurven	112
7	Die Adenylatkinasen	113
7.1	Anreicherung der Adenylatkinasen	113
7.2	Charakterisierung der Adenylatkinasen	116
7.2.1	Aussagen zur Reinheit der hergestellten Präparate	116
7.2.2	Bestimmung des pH - Optimums	116
7.2.3	Ionale Bedürfnisse der Adenylatkinasen	117
7.2.4	Temperatureinfluß	118
7.2.5	Molekulargewichtsbestimmung	119
7.2.6	Substratsättigungskurven	120

		Seite
8	Pyrophosphatasen	121
8.1	Wachstumsphysiologische Untersuchungen	121
8.2	Anreicherung der Pyrophosphatasen	124
8.2.1	Herstellung des zellfreien Extraktes	124
8.2.2	Ionenaustauschchromatographie	124
8.2.3	Ammoniumsulfatfraktionierung	124
8.2.4	Gelfiltration	124
8.3	Untersuchungen am gereinigten Enzymextrakt	125
8.3.1	Zeitliche Linearität des Substratumsatzes	125
8.3.2	pH - Optima	125
8.3.3	Ionale Bedürfnisse	127
8.3.4	Substratspezifität	128
8.3.5	Stabilität der Pyrophosphatasen	128
8.3.6	Molekulargewichtsbestimmung	129
8.3.7	Kinetische Daten der angereicherten Pyrophosphatasen	129
9.	Aussagen zum Energiegewinn durch Substratphosphorylierung	130
10	Die Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase als weiteres sulfitoxidierendes Enzym	133
10.1	Haben die aus C.gracile angereicherten Cytochrome Sulfitoxidaseeigenschaften?	134
10.2	Anreicherung der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktasen aus C.gracile und C.vinosum	135
10.2.1	Anreicherung der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase aus Chromatium gracile	136
10.2.2	Anreicherung der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase aus Chromatium vinosum	136
10.3	Cytochrome als Elektronenakzeptoren der angereicherten Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase	136
10.4	Charakterisierung der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase aus Chromatium vinosum	138
10.4.1	pH - Optimum	138
10.4.2	Molekulargewichtsbestimmung	138
10.4.3	Temperaturoptimum	139
10.4.4	Einfluß der Temperatur auf die Stabilität	140
10.4.5	Substratsättigungskurven	140

		Seite
IV	Diskussion	141
1	Möglichkeiten einer zusätzlichen Energiegewinnung durch Substratphosphorylierung	141
1.1	Die APS - Reduktase aus Chromatiaceae	141
1.2	Die ADP - Sulfurylase als Schlüsselenzym bei der Umwandlung von Bindungsenergie in ATP	148
1.3	Nachweismethoden	149
1.4	Eigenschaften der untersuchten ADP - Sulfurylasen	149
1.5	Vergleichende Darstellung der ATP - Sulfurylasen	153
1.6	Pyrophosphatasen als Substratkonkurrenten der ATP - Sulfurylasen	156
1.7	Enzymatische Nutzungskriterien der im APS enthaltenen Energie	159
1.8	Pyrophosphat - abhängige Enzyme	164
	Zusammenfassung	167
	Literaturverzeichnis	171

Abkürzungen

A	Extinktion
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Adenosin - 5' - phosphosulfat
at	Atmosphäre
ATP	Adenosintriphosphat
C.	Chromatium
CMP	Cytosinmonophosphat
Cyt.	Cytochrom
D.	Desulfovibrio
DEAE	Diethylaminoethyl
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorgaismen
DTE	1,4 Dithioerythrit
E	Einheiten
e^-	Elektron
ΔE	Extinktionsdifferenz
$E_{x\ nm}$	Extinktion bei x nm
	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
g	Erdbeschleunigung
G-6-P-DH	Glucose - 6 - Phosphatdehydrogenase
GMP	Guanosinmonophosphat
GSH	Glutathion
h	Stunde
HEA	Hühnereiweißalbumin
HK	Hexokinase
HPTLC	high performance thin layer chromatography
K_{app}	Gleichgewichtskonstante
Kat.	Katalog
K_i	Inhibitorkonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
LDH	Lactatdehydrogenase
Lsg.	Lösung

M	Molar
µm	Mikromolar
mA	Milli - Ampere
mM	Millimolar
mg	Milligramm
min	Minute
N	Normal
NAD^+	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
NADP (H)	Nicotinamidadenindinucleotid-phosphat (reduziert)
NEM	n-Ethylmaleinimid
NHE	Nichthäm-Eisen
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ox.	oxidiert
p-CMB	para-Chloromercuribenzoesäure
PI	Purity index
P_i	anorganisches Phosphat
PP_i	anorganisches Pyrophosphat
PPase	anorganische Pyrophosphatase
PAPS	3' - Phosphoandenosin - 5' - Phosphosulfat
R_f	Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit von Substanzen
	$\frac{\text{Strecke: Startpunkt - Substanzfleck}}{\text{Strecke: Startpunkt - Lauffront}}$
red.	reduziert
RSA	Rinderserumalbumin
sec	Sekunde
SH -	Sulfhydryl-
Spez.Akt.	Spezifische Aktivität
Sv	Sammelvolumen
T.	Thiobacillus
T_{50}	Temperatur, bei der die Ausgangsaktivität um 50% vermindert ist
TCA	Trichloressigsäure

Tris	Tris (hydroxymethyl) aminoethan
U	Unit
UMP	Uridinmonophosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V_o	Leervolumen
V_e	Elutionsvolumen
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

I Einleitung

Die Thiobacilli und die Chromatiaceae gehören zu der großen Gruppe der lithotrophen Schwefelbakterien, bei denen die energieliefernden Reaktionen gekoppelt mit der Oxidation anorganischer Schwefelverbindungen ablaufen.
Die Chromatiaceae sind in der Lage, ein rein photolithoautotrophes Wachstum durchzuführen. Dabei verwenden sie reduzierte anorganische Schwefelverbindungen als Elektronendonatoren für ihre anoxigene Photosynthese.
Die aus der Oxidation der Schwefelverbindungen resultierenden Elektronen dienen gemäß der von van Niel (1931) aufgestellten Photosynthesegleichung der reduktiven CO_2-Assimilierung.

Während bei den phototrophen Chromatiaceae die bioenergetische Nutzung der Strahlungsenergie eindeutig im Vordergrund des Energiestoffwechsels steht, ziehen die Thiobacilli bei chemolithoautotrophem Wachstum ihre Energie fast ausschließlich aus der Oxidation schwefelhaltiger Verbindungen.

Schon frühzeitig (Vogler, 1942; Vogler und Umbreit, 1943) wurde die Vermutung geäußert, daß Thiobacillus thiooxidans in der Lage ist, während einer Substratphosphorylierung anorganisches Phosphat in energiereiche Adenosinphosphate umzuwandeln, die zur CO_2-Fixierung verwendet werden können.
Untersuchungen von Baalsrud und Baalsrud (1952) zeigten, daß die Oxidation von Thiosulfat durch Thiobacillus denitrificans unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Phosphat beschleunigt ablief.
Den Ergebnissen von Santer et al. zufolge (1959) konnte in Thiobacillus thioparus nur in Gegenwart einer Mindestphosphatmenge (14 µmol) eine vollständige Oxidation des Thiosulfats zum Sulfat beobachtet werden. Enthielt der Ansatz kein Phosphat, wurden nur ca. 70% der Schwefelquelle zu Sulfat umgesetzt.
Die Autoren folgerten, daß das Phosphat bei der Umwandlung des Thiosulfats eine katalytische Funktion einnähme.

Ende der fünfziger Jahre wurde von Robbins und Lipmann (1957, 1958) in der Bäckerhefe das Vorkommen einer energiereichen Phos-

phoschwefelverbindung nachgewiesen.
Das von ihnen entdeckte Adenylylsulfat (Adenosinphosphosulfat, APS) nimmt eine zentrale Stellung im natürlichen Kreislauf des Schwefels ein, da es sowohl im assimilatorischen (DeMeio, 1975) wie im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel (Trüper, 1975) von Bedeutung ist.
Das APS gehört als Schwefelesterverbindung mit einem chemischen Bindungspotential von -82 KJ/mol zu den energiereichsten biologischen Verbindungen.
In den Thiobacilli (Peck, 1962; Peck et al. , 1965; Bowen et al. , 1966) und den phototrophen Schwefelbakterien wird das aktivierte Sulfat im Zuge des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels durch das Enzym APS - Reduktase aus AMP und Sulfit gebildet (Trüper und Peck, 1970).
Wie vergleichende enzymphysiologische Studien der gereinigten APS - Reduktasen ergaben (Peck et al. , 1965; Bowen et al. , 1966; Trüper und Rogers, 1971; Kirchhoff und Trüper, 1974), zeigten die isolierten Enzyme große Ähnlichkeiten hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer physiologischen Leistungen.

Um die im Adenylylsulfat gespeicherte Energie für den Organismus zugänglich zu machen, schlug Peck (1960) für Thiobacillus thioparus eine Enzymsequenz vor, in der durch die ADP - Sulfurylase der nukleophile Austausch der Sulfatgruppe im APS gegen Phosphat katalysiert wird.
Das bei dieser Reaktion freigesetzte ADP kann in einem nachfolgenden Schritt durch die Adenylatkinase in ATP und AMP umgewandelt werden.

Die Existenz einer solchen ADP - Sulfurylase konnte auch für Thiocapsa roseopersicina (Thiele, 1966, 1968) nachgewiesen werden.

Das Vorkommen von APS - Reduktase und ADP - Sulfurylase in phototrophen Schwefelbakterien veranlaßte Trüper (1971) zu der Vermutung, daß der von Peck und Fisher (1962) und Peck und Stulberg (1962) nachgewiesene enzymatische Mechanismus der Energiegewinnung auch von phototrophen Organismen beschritten wird.

In allen untersuchten Thiobacilli war neben oder statt der APS - Reduktase mit der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase ein weiteres sulfitoxidierendes Enzym nachgewiesen worden, das die enzymatische Umsetzung von Sulfit zum Sulfat katalysiert (Charles und Suzuki, 1966; Lyric und Suzuki, 1970a ; Moriarty, 1969; Aminuddin und Nicholas, 1973; Vestal und Lundgren, 1971).
Diese direkte Oxidation des Sulfits zum Sulfat verläuft ohne zusätzlichen Energiegewinn.

Nachdem zuvor von Thiele (1966) das Vorhandensein eines solchen Enzyms in phototrophen Organismen verneint worden war, konnte in Thiocapsa roseopersicina (Petushkova und Ivanovskii, 1976), in Chromatium vinosum (Brückenhaus, 1977), sowie in Chromatium purpuratum und Chromatium minutissimum (Ulbricht, 1981) das Vorkommen eines AMP-unabhängigen sulfitoxidierenden Enzyms nachgewiesen werden.

Gleichzeitig häuften sich die Befunde, in denen die allgemeine Gültigkeit des von Peck (1960) vorgeschlagenen Reaktionsweges der Substratphosphorylierung angezweifelt wurde.
1979 konnte Schug in Thiobacillus denitrificans Stamm RT hohe spezifische Aktivitäten einer ATP - Sulfurylase nachweisen, die mit der ADP - Sulfurylase um das gemeinsame Substrat APS konkurrierte.

An einem anderen Stamm von Thiobacillus denitrificans gelang Aminuddin (1981) über Hemmstoffversuche der Nachweis, daß neben der ADP - Sulfurylase auch die ATP - Sulfurylase an der Umsetzung des aktivierten Sulfats in biologisch nutzbare Energie beteiligt ist, wobei er dem Energiegewinn über ADP - Sulfurylase und Adenylatkinase eine weitaus geringere Bedeutung beimaß.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aussagekraft der von Peck (1960) und Aminuddin (1981) aufgestellten Thesen zum Energiegewinn durch Substratphosphorylierung kritisch zu überprüfen.

Die dazu notwendigen Untersuchungen sollten zunächst an Thiobacillus denitrificans Stamm RT durchgeführt werden.
Diesem Organismus kommt unter den Thiobacilli eine Sonderstellung zu (Baldensperger und Garcia, 1975), da er als einziger fa-

kultativ anaerob zu leben vermag und über einen ähnlichen Schwefelstoffwechsel wie die phototrophen Schwefelbakterien verfügt (Schedel, 1978).

Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der Bedeutung der ATP - Sulfurylase gewidmet.
Die Aufgabe des Enzyms wurde bisher einzig darin gesehen, das sehr stabile und wenig reaktive Sulfat für die biosynthetischen Aufgaben des Schwefelstoffwechsels zu aktivieren.
Dabei liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion mit $K_{app} = 10^{-8}$ weit auf Seiten des ATP und des Sulfats (Robbins und Lipmann, 1958).
Um die quantitative Ausbeute an APS zu erhöhen, wird eine anorganische Pyrophosphatase benötigt, die das PP_i durch phosphorolytische Spaltung fortwährend aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt.
In vielen Organismen wird in einer nachgeschalteten Reaktion das aktivierte Sulfat durch die APS - Kinase in der 3' - Stellung zu PAPS phosphoryliert; PAPS dient als aktivierte Vorstufe zahlreicher Sulfatesterverbindungen.

Ausgehend von APS und PAPS erfolgt dann im Rahmen des assimilatorischen Schwefelstoffwechsels die Reduktion zum SH - Niveau und die Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren.

Der Nachweis einer APS - Kinase in Thiobacillus denitrificans konnte von Schedel und Trüper (1979) nicht erbracht werden.
Die im gleichen Organismus vorgefundenen hohen spezifischen Aktivitäten der ATP - Sulfurylase (Schug, 1979; Aminuddin, 1981) sprechen ebenfalls für eine Beteiligung der ATP - Sulfurylase am dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel, da dieser im Gegensatz zum assimilatorischen durch einen hohen Massenumsatz und dementsprechend hohen Aktivitäten der beteiligten Enzyme charakterisiert ist.

Um definitive Aussagen über die tatsächliche Funktion der ATP - Sulfurylase im Rahmen des Schwefelmetabolismus tätigen zu können, sollten ihre physiologischen und kinetischen Eigenschaften eingehend studiert und mit denen der ADP - Sulfurylase verglichen werden.

Die für Thiobacillus denitrificans erzielten Ergebnisse sollten zum Schwefelmetabolismus kleinzelliger Vertreter der Chromatiaceae in Bezug gesetzt werden.
Dabei sollte generell die Frage der enzymatischen Sulfitumwandlung aufgeklärt werden.

Bei Vorkommen des Schlüsselenzyms der Substratphosphorylierung, der APS - Reduktase, sollten die enzymatischen Wege untersucht werden, auf denen die Bindungsenergie des APS in biochemisch verwertbare Energie in Form der Adenylate ADP und ATP überführt wird.

Nach den Ergebnissen von Krasilnikova (1976) sowie Kämpf und Pfennig (1980) sind die kleinzelligen Vertreter der Chromatiaceae zu einer Lebensweise unter microaerophilen Bedingungen im Dunkeln befähigt, während die großzelligen Chromatiaceae nur unter strikt photolithoautotrophen Bedingungen zu wachsen vermögen (Kämpf und Pfennig, 1980).
Da die großen Arten wie Chromatium weissei, Chromatium okenii und Chromatium warmingii sich auch in anderer physiologischer Hinsicht, wie etwa dem Fehlen einer assimilatorischen Sulfatreduktion (Trüper und Pfennig, 1982) von den anderen Chromatiaceae unterscheiden, sollte mit Chromatium warmingii einer ihrer typischen Vertreter im Hinblick auf die enzymatischen Möglichkeiten eines Energiegewinns durch Substratphosphorylierung mituntersucht werden.

Bisher unbeantwortet ist auch die Frage nach dem natürlichen in vivo Elektronenakzeptor der APS - Reduktase.
Zwar konnten im photometrischen Testsystem für T.thioparus (Lyric und Suzuki, 1970b), Thiobacillus denitrificans (Aminuddin, 1979) und Thiocapsa roseopersicina (Trüper und Rogers, 1971) Cytochrom c als Elektronenakzeptor eingesetzt werden, aber bisher wurde noch nicht von einer erfolgreich durchgeführten Reduktion eines nativen Cytochroms im Zuge der Sulfitoxidation bei gleichzeitigem Entstehen von aktiviertem Sulfat berichtet.

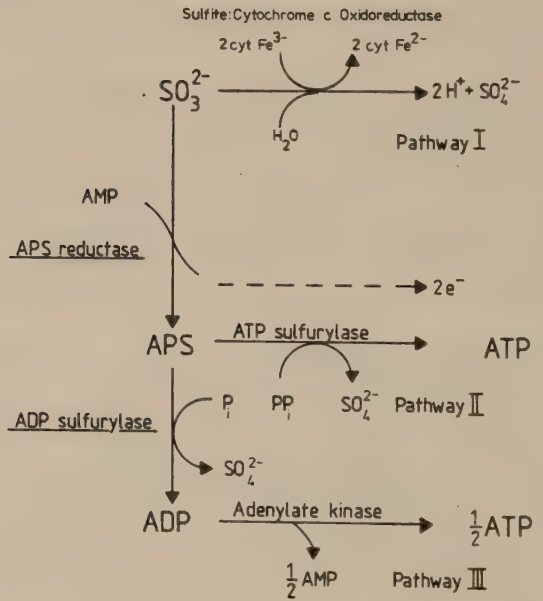
Von einem Vertreter der Chromatiaceae sollten deshalb die Cytochrome isoliert, gereinigt und auf ihre mögliche Funktion als Elektronenakzeptor der APS - Reduktase untersucht werden.

Die Abbildung 1 faßt alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Enzyme zusammen und zeigt ihre physiologische Bedeutung bei der

Umwandlung des Sulfits zum Sulfat auf.

Dabei können mehrere Wege beschritten werden, wobei zeitweilig Enzyme unterschiedlicher Wege um ein gemeinsames Substrat konkurrieren müssen.
Der Kinetik dieser Enzyme wurde ein besonderes Interesse gewidmet.

Abbildung 1: Verschiedene Möglichkeiten der enzymatischen Sulfitumwandlung unter Berücksichtigung des dabei möglichen Energiegewinns



II Material und Methoden

1. Mikrobiologische Methoden

1.1 Organismen

Chromatium warmingii Stamm 6512 (DSM 173) wurde für die vorliegenden Untersuchungen freundlicherweise von Herrn Diplombiologen W. Leyendecker zur Verfügung gestellt.
Alle weiteren untersuchten Bakterienstämme wurden der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie in Bonn entnommen. Dabei handelte es sich um die folgende Organismen:
Chromatium purpuratum (DSM 1519)
Chromatium minutissimum (BN 983b)
Chromatium gracile (DSM 203)
Chromatium vinosum (BN 986)
Thiobacillus denitrificans RT

1.2 Nährmedien

1.2.1 Nährmedium für Thiobacillus denitrificans

Thiobacillus denitrificans RT wurde, wie von Schedel (1978) beschrieben, auf einem reinen Mineralnährboden angezogen, welcher die folgende Zusammensetzung hatte:

Komponente A	7.5 g/l	$Na_2S_2O_3 \times 5\ H_2O$
	5.0 g/l	KNO_3
	0.5 g/l	$MgCl_2$
	0.2 ml	einer zehnfach konzentrierten Spurenelementlösung nach Pfennig und Lippert (1966)
Komponente B	2.7 g/l	KH_2PO_4
Komponente C	3.9 g/l	$NaHCO_3$

Komponente A wurde in 930 ml, B in 20 ml und C in 50 ml destilliertem Wasser resuspendiert und getrennt voneinander autoklaviert.

Nach dem dem Abkühlen wurden die Lösungen vereinigt. Der pH-Wert der fertigen Kulturlösung nahm einen Wert zwischen 6.9 und 7.1 an. Das Animpfen erfolgte mit einer Vorkultur (10% v/v) aus der exponentiellen Wachstumsphase, die in einem Medium gleicher Zusammensetzung angezogen worden war.
Für die Anzucht größerer Zellmengen wurden die Konzentrationen des

Thiosulfats und des Nitrats auf jeweils 12.5 g/l resp. 6.0 g/l heraufgesetzt.

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 30°C in fast vollständig gefüllten 1l Schraubverschlußflaschen angezogen, deren Deckel ob der Gasproduktion nicht fest verschlossen wurde.
Die Zellen wurden abgeerntet, wenn die Suspension eine optische Dichte von 0.7 (650 nm) erreicht hatte.
Gut gewachsene 100 ml Kulturen wurden als Stammkulturen verwendet; sie konnten über einen längeren Zeitraum im Kühlschrank gelagert werden.

1.2.2 Nährmedium für kleine Chromatiaceae

Die Vertreter der kleinen Chromatiaceae Chromatium minutissimum
Chromatium vinosum
Chromatium gracile
und Chromatium purpuratum

wurden nach den von Imhoff (1976) vorgeschlagenen Methoden angezogen. Die Nährlösung für die photolithoautotrophe Anzucht der Organismen umfaßte die folgenden Komponenten:

Komponente A	K_2HPO_4	0.5 g/l
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.4 g/l
	$CaSO_4 \times 2\ H_2O$	0.4 g/l
	NH_4Cl	1.5 g/l
	$NaHCO_3$	3.5 g/l
	NaCl	30.0 g/l
Komponente B	$(Na)_2S_2O_3$	1.5 g/l
Komponente C	Vitaminlsg. VA	1 ml
	Spurenelement-lösung SLA	1 ml

Die Komponenten A und B wurden getrennt voneinander autoklaviert und nach Abkühlen der Lösungen miteinander vereinigt.
Die Vitamin- und die Spurenelementlösung wurden über einen Seitz-Filter (EKS) sterilfiltriert und dem Medium mit Hilfe einer sterilen Pipette zugesetzt.
Der pH-Wert der Nährlösung wurde durch tropfenweise Zugabe einer 2 N H_2SO_4-Lösung auf einen pH um den Neutralpunkt eingestellt.

Die Anzucht erfolgte bei ca. 30°C in einem Lichtbrutraum in 1l Schraubverschlußflaschen. Die Beleuchtungsstärke betrug dabei 1 000 lux.

Wurden größere Zellmengen innerhalb kürzester Zeit benötigt und waren nicht genügend 1l Schraubverschlußflaschen verfügbar, erfolgte die Anzucht in mehreren 20l Carboys gleichzeitig.
Die Carboys wurden wie die 1l Rundflaschen mit einem Inokulum von 20% angeimpft, wobei eine optimale durch stetiges Rühren der Zellsuspension über eine Magnetbank und eine gleichzeitige Bestrahlung durch 4 Attraluxlampen aus verschiedenen Standorten gewährleistet wurde.

Die Spurenelementlösung hatte folgende Zusammensetzung:

EDTA	5 g/l	
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	2 g/l	
$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	100 mg/l	Die Lösung ist in verschlossenen,
$MnCl_2 \times 4 H_2O$	30 mg/l	lichtgeschützten Flaschen bei Tem-
H_3BO_3	300 mg/l	peraturen um 4°C über mehrere Mona-
$CoCl_2 \times 6 H_2O$	10 mg/l	te haltbar. Je nach Bedarf wurden
$CuCl_2 \times 6 H_2O$	200 mg/l	zur Zellanzucht adäquate Mengen durch
Na_2MO_4	30 mg/l	Filtration sterilisiert.
$NiCl_2 \times 6 H_2O$	20 mg/l	

In der Vitaminlösung waren enthalten:

Biotin	10 mg/l
Nicotinsäureamid	350 mg/l
Thiamindichlorid	300 mg/l
p-Aminobenzoesäure	200 mg/l
Pyridoxolchlorid	100 mg/l
Kalziumpanthothenat	100 mg/l
Vitamin B_{12}	50 mg/l

Die aufgeführten Substanzen wurden in 1l bidestilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und in 50 ml Schraubverschlußfläschchen bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

1.2.3 Nährmedium für Chromatium warmingii

Das Grundmedium für Chromatium warmingii (Pfennig, 1965, 1982;) setzt sich aus 4 Komponenten zusammen:

Komponente A:	Aqua demin	2500 ml
	$CaCl_2$	0.9 g
Komponente B:	Aqua demin.	94 ml
	Spurenelementlösung SL_4 zehnfach konzentriert	3 ml
	Vitamin B_{12} (2 mg/100 ml)	3 ml
	KH_2PO_4	1 g
	NH_4Cl	1 g
	$MgCl_2$	1 g
	KCl	1 g
Komponente C:	Aqua demin.	900 ml
	$NaHCO_3$	4.5 g
Komponente D:	Aqua demin.	200 ml
	Na_2S	3 g

Erfolgte die Zellanzucht in 1l Schraubverschlußflaschen, wurden jeweils 50 ml der Komponente D in die Flaschen abgefüllt. Um eine Autoxidation des gelösten Sulfids weitestgehend zu verhindern, wurde der in den Flaschen befindliche Sauerstoff durch Begasen mit N_2 ausgetrieben. Nach dem Autoklavieren wurde die Sulfidlösung dur Zugabe von 0.5 ml 1N HCl teilneutralisiert.
Komponente C wurde 30 min mit CO_2 begast, anschließend mit den Komponenten A und B vereinigt und unter Verwendung eines Seitz-Filters (EKS 1, Druckgas N_2) steril in die 1l Flaschen gefüllt.

Das Medium wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert und konnte nach Auftreten eines schwarzen Niederschlages zur Zellanzucht verwendet werden. Vor dem Animpfen wurde der pH - Wert der Nährlösung durch Zugabe einiger Tropfen steriler 1 N HCl auf einen Wert zwischen pH 6.9 und 7.2 eingestellt.

Aufgrund einer geringen Sulfidtoleranz (Van Niel, 1971) wurden die Kulturen von Chromatium warmingii mit einer 0.07 prozentigen

Sulfidlösung nachgefüttert. Nach dreimaligem Zusatz der Fütterlösung wurde eine maximale Zellausbeute erzielt.

1.2.4 Nährmedium für Desulfurikanten

Das Nährmedium diente zum Nachweis von Desulfurikanten, die zeitweilig als Verunreinigungen in den Chromatiaceaekulturen auftraten.

Zusammensetzung des Mediums (nach Lapage et. al., 1970)

Lösung A:	H_2O dest	980 ml
	K_2HPO_4	0.5 g
	Na_4Cl	1.0 g
	Na_2SO_4	1.0 g
	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0.1 g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	2.0 g
	Natriumlaktat (70%)	3.5 g
	Hefeextrakt	1.0 g
Lösung B:	H_2O dest	10 ml
	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0.6 g
Lösung C:	H_2O dest	10 ml
	Ascorbat	0.1 g
	Natriumthioglycolat	0.1 g

Die Lösungen wurden auf pH 7.4 eingestellt und getrennt voneinander autoklaviert.
Vor dem Gebrauch wurden die Komponenten im Verhältnis von 1:1:1 in 100 ml Schraubverschlußfläschchen vereinigt und mit wenigen ml der Probe versetzt.
Zur Gewährleistung eines günstigen Redoxpotentials wurde der Nährlösung ein abgeflammter Eisennagel (Abd-El-Malek und Rizk, 1960) beigegeben. Das Wachstum von Desulfurikanten gab sich an einer deutlichen Trübung (Schwarzfärbung) zu erkennen.

1.2.5 Anlegen von Agar-Schüttelkulturen (nach Pfennig und Trüper, 1982)

Bei Zweifel an der Reinheit der phototrophen Kulturen wurden Agar-Schüttelkulturen angelegt.

Komponente A: 1.8% Agar (Oxoid 1)
Komponente B: Pfennigs Medium (1.2.3)
Komponente C: Paraffinöl/Paraffin (s. 1.2.3)

Die flüssige Agarlösung wurde in 3 ml Portionen auf Reagenzgläser verteilt, die mit einem Wattestopfen verschlossen und autoklaviert wurden. Nach erfolgter Sterilisation wurde der Agar bei 50°C flüssig gehalten und unter sterilen Bedingungen mit einer bei gleicher Temperatur vorinkubierten Lösung von 6 ml Pfennigs Medium versetzt. Eines der Agarröhrchen wurde mit wenigen Tropfen der zu untersuchenden Kultur versetzt. Nach gutem Durchmischen der Lösung wurden 0.5 ml der Flüssigkeit steril entnommen und auf das nächste Röhrchen übertragen. Dieser Vorgang wurde insgesamt 6 x wiederholt.

Unmittelbar nach dem Erstarren wurden die Proben mit einer 2 - 3 cm dicken Schicht flüssigen Paraffins steril und luftdicht verschlossen. Die Röhrchen wurden für 2 - 3 Stunden im Dunkeln gehalten, bevor sie bei 28°C und einer Lichtintensität von 400 - 800 lux angezogen wurden.
Zeigten die Agarkulturen Verunreinigungen, wurde aus der letzten Verdünnungsstufe mit einer sterilen, ausgezogenen Pasteurpipette eine vereinzelnt liegende Kolonie entnommen, in wenig Nährmedium suspendiert und erneut über eine Agar-Reihe gereinigt.

Nach maximal 3 weiteren Passagen lag wieder eine Reinkultur vor. Eine vereinzelt liegende Kolonie wurde dem Agar mit einer Pasteurpipette entnommen und in einem 10 ml Probenfläschchen mit Pfennigs Medium resuspendiert. Die Aufzucht der Flüssigkultur erfolgte unter Schwachlicht in einem sechsstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus.

1.3 Prüfung auf Reinheit der Kulturen

Die Reinheit von T.denitrificans RT wurde mikroskopisch oder durch Ausstreichen auf verfestigtem Nährmedium (1,2% Difco-Agar) bei anschließender Bebrütung in einem Gaspak-Anaerobiergefäß (10% CO_2,

15% O_2 und 75% N_2) bei 30°C überprüft.

Die phototrophen Organismen galten als rein, wenn folgende Bedingungen erfüllt waren:

1. Das mikroskopische Bild bei Probeentnahme mußte einheitlich sein.
2. In der Agarverdünnungsreihe durfte nur eine Kolonieform auftreten.
3. Im Medium für Sulfatreduzierer durfte kein Wachstum erfolgen.

1.4 Sauerstoffabsorptionsmittel

Bei der Begasung von Bakterienzellkulturen und der Probeentnahme wurde zur Sauerstoffabsorption ein Reduktionsmittel nach Nickerson und Strauß (1960) verwendet.
Dabei wurde der Stickstoff durch eine Waschflasche geleitet, die 30 mg Riboflavin, 5 mg Methylenblau und 75 g EDTA enthielt.
Die Photoreduktion des Systems erfolgte durch Beleuchtung mit einer 60 Watt Glühbirne.

1.5 Messung des Bakterienwachstums

1.5.1 Trübungsmessung

Die Trübung der Zellsuspensionen wurde bei Thiobacillus denitrificans RT und den untersuchten phototrophen Organismen bei 650 nm gegen die jeweilige Nährlösung im Zeiss Spektralphotometer PM 4 gemessen.
Proben mit einer Extinktion >0.3 wurden mit Nährlösung verdünnt.

1.5.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Es wurden jeweils 20 ml einer Zellsuspension abzentrifugiert und zweimal gegen H_2O dest gewaschen.
Die sedimentierten Zellen wurden in 3 ml H_2O dest resuspendiert; der Proteingehalt dieser Probe wurde nach der Methode von Stickland (1951) bestimmt.

1.6 Wachstumsversuche

Die Wachstumsexperimente mit Thiobacillus denitrificans RT wurden in einem 20l Carboy mit dem unter (II, 1.2.1) aufgeführten Nährmedium bei 30°C durchgeführt.
Der Carboy war mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen: 2 der 3 Bohrungen standen mit Watte ausgefüllten Begasungsröhrchen in Verbindung, die die Möglichkeit einer sterilen Gaszu - und abfuhr gewährleisteten.
Über die 3. Bohrung wurde mit Hilfe eines bis zum Boden des Carboys führenden Schlauches die Proben entnommen.
Der Schlauchauslauf der Bohrung wurde zwischen den einzelnen Probeentnahmen in Alkohol aufbewahrt.
Die Carboys wurden mit 10% (v/v) Inokulum angeimpft; die Vorkulturen befanden sich immer in der exponentiellen Wachstumsphase.

Nach Animpfen der Kultur wurde zum Erreichen anaerober Verhältnisse mit sauerstoffreiem, sterilem Stickstoff begast.
Zu destinkten Zeitpunkten wurden der Kultur Aliquots der Zellsuspension bei geschlossenem Gasausgang unter leichtem Stickstoffüberdruck entnommen.

Bei Anzucht der phototrophen Organismen wurden die Carboys mit drei symmetrisch aufgebaute Attralux - Lampen (je 100 Watt) ausgeleuchtet.
Wegen der hohen Wärmeentwicklung wurden zwischen das Kulturgefäß und die Lichtquellen mit Wasser gefüllte Steilbrustflaschen gestellt, deren Inhalt alle 12h gegen kühles Leitungswasser ausgetauscht wurde.

1.7 Zellernte

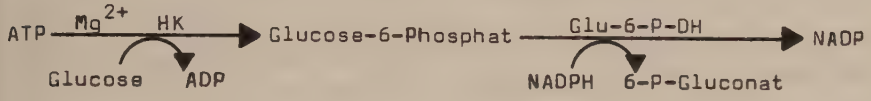
Geringe Mengen an Kulturvolumen wurden entweder in einer Sorvall RC 2B resp. einer Sorvall RC 5 (DU PONT) oder in einer Cryofuge 20 - 3 (Heraeus-Christ) bei 10 000 UpM abgeerntet.

Die Sedimentation größerer Zellmengen (Volumina >10l) erfolgte im Laborseparator KA (Westfalia) bei einer Durchflußrate von 4l/h.
Die erhaltene Zellpaste wurde 2 x in einem 50 mM Tris - HCl Puffer (pH 8.0) gewaschen und dann entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -18°C tiefgefroren gelagert.

2 Enzymatischer Nachweis verschiedener Adenylate

2.1 Nachweis für ATP, APS und PAPS

Die quantitative ATP - Bestimmung erfolgte spektralphotometrisch unter Einsatz der Hilfsenzyme Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.
Das folgende Chema verdeutlicht das zugrunde liegende Testprinzip:



Ausgangspunkt für alle quantitativen Bestimmungen ist ATP, das seine endständige Phosphatgruppe in 6' - Position auf die Glukose überträgt.
In der Folgereaktion wird der bei der Oxidation des Glukose-6-Phosphats anfallende Wasserstoff auf NADP übertragen.
Da die Menge an vorhandenem ATP in der Probe in äquimolarer Beziehung zum gebildeten NADP steht, wird die ATP - Konzentration letztlich durch Ermittlung der Extinktionszunahme bei 340 nm errechnet.

Testansatz zur ATP - Bestimmung:

Tris - HCl Puffer, pH 8.0		100 mM	
$MgCl_2$ x 6 H_2O		1 mM	
Glukose		20 mM	
NADP (als Natriumsalz)		1 mM	
Glukose-6-Phosphat-DH		10 E	
Probe (maximal 100 nM ATP)			
H_2O dest	ad	1 ml	Gesamtvolumen

Die angegebenen Reagenzien wurden in eine 1 ml Glasküvette pipettiert und die Extinktionsänderung bei 340 nm über den Schreiber des Zeiss PM 4 registriert.
Durch Oxidation der Glukose und der damit einhergehenden Reduktion des NADP wurde ein leichtes Ansteigen der Extinktion ermittelt.
Nach Stabilisierung des Leerwertes wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 E Hexokinase gestartet und bis zum Erreichen des Re-

aktionsgleichgewichtes verfolgt.
Die quantitative Bestimmung der ATP - Konzentration erfolgte über den angenommenen Wert der Extinktionszunahme unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten für NADP.

Sollte die Konzentration von APS im Ansatz ermittelt werden, wurde dieses zunächst in einer vorgeschalteten Reaktion unter Zuhilfenahme von ATP - Sulfurylase in ATP umgewandelt.

PAPS wurde durch 3' - Nucleotidase zu APS dephosphoryliert, welches dann wie oben beschrieben in ATP umgewandelt wurde.

Zusammensetzung des Tests zur quantitativem APS/PAPS - Bestimmung

Tris - HCl Puffer, pH 8.0	100	mM
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	1	mM
Glukose	20	mM
NADP (als Natriumsalz)	1	mM
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	10	E
$Na_4P_2O_7$	1	mM
Probe (maximal 100 nmol APS/PAPS		
H_2O dest	ad 1	ml Gesamtvolumen

Die Komponenten wurden in eine 1cm Glasküvette pipettiert und die durch die Glukoseoxidation bedingte Extinktionszunahme bei 340 nm im Zeiss PM 4 registriert.
Nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes wurde PAPS durch Zugabe von 10 E 3' - Nukleotidase gespalten.
Das entstandene APS wurde durch Zugabe von ATP - Sulfurylase (10 E) in ATP umgewandelt.
Nach Einstellen des 2. Reaktionsgleichgewichtes wurde die Konzentration an APS resp. PAPS in der Probe aus der Extinktionszunahme ermittelt.

2.2 Enzymatischer ADP - Nachweis (modifiziert nach Jaworek et al., 1970)

Die Ermittlung der ADP - Konzentration erfolgte wiederum im gekoppelten optischen Test.

Die Pyruvatkinase überträgt die Phosphatgruppe des PEP auf ADP. Das entstandene Pyruvat wird im folgenden enzymkatalysierten Schritt zu Lactat reduziert.
Das dabei entstehende NAD^+ ist äquimolar zu dem ADP - Gehalt der eingesetzten Proben.
Der Reaktionsansatz enthielt:

Tris - HCl Puffer, pH 8.0	100	mM	
PEP (als Natriumsalz)	0.4	mM	
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	1	mM	
LDH	10	E	
NADH (als Natriumsalz)	2	mM	
Pyruvatkinase	10	E	
Probe			
H_2O dest	ad 1	ml	Gesamtvolumen

Die proteinfreie Probe wurde mit dem Testansatz bei 25°C in einer 1 ml Glasküvette zur Aufnahme des Leerwertes in einem Zeiss PM 4 vorinkubiert. Die eigentliche Reaktion wurde durch Zugabe der Pyruvatkinase gestartet.
Anhand der ermittelten Extinktionsänderung bei 340 nm (unter der Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH) konnte auf die im Testansatz enthaltene Menge an ADP rückgeschlossen werden.

2.3. Dünnschichtchromatographischer Nachweis verschiedener Adenylate

Zur schnelleren Erkennung und Differenzierung der Adenylate AMP, ADP, ATP, APS und PAPS wurden die Proben einer Hochleistungsdünnschichtchromatographie unterworfen.
Dazu wurden die HPTLC - Platten der Fa. Merck, Darmstadt (Kieselgel 60 F_{254} für Nano-DC) verwendet.
Die Proben wurden über eine Hamilton - Spritze in möglichst geringen Mengen (≤ 1 µl) in einem Abstand von 1 cm auf eine mit Bleistift markierte Startlinie aufgetragen.
Als Vergleichsreferenzen dienten identische Mengen 1 mM Lösungen

entsprechende Adenylate.
Die aufgetragenen Proben wurden luftgetrocknet und dann zur Entwicklung in den entsprechend präparierten Chromatographietank gegeben.
Das Chromatographiegefäß (Camag, Berlin) war einige Stunden zuvor mit 10 ml eines Lösungsmittelgemisches (iso-Propanol, 33prozentiger Ammoniak und Wasser im Verhältnis von 6:3:1) beschickt worden, um eine Kammersättigung zu gewährleisten.
Nach einer Laufzeit von 30 min wurde der Versuch gestoppt und die Adenylate unter der UV - Lampe bei 289 nm über die R_f-Werte oder durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen identifiziert.

3 Enzymologische Methoden

3.1 Herstellung zellfreier Extrakte

Die (tiefgefroren gelagerte) Zellpaste wurde in der dreifachen Menge eines 50 mM Tris - HCl Puffers (pH 7.6) resuspendiert.
Die Zellsuspension wurde mit dem Ultra-Tyrax homogenisiert und durch zweimalige Passage durch eine Aminco French Press bei 8×10^6 Pa aufgeschlossen.
Chromatium warmingii wurde vorzugsweise durch Ultraschallbehandlung (Bronson Sonifier Cell Disruptor B 15, maximale Beschallungsleistung, Arbeitstemperatur 4^oC) aufgebrochen. Die Beschallungszeit betrug 30 sec pro ml Zellsuspension.
Das aufgeschlossene Zellmaterial wurde für 15 min in einer Sorvall RC 2B bei 15 000 UpM in einem SS 34 Rotor abzentrifugiert, um grobe Zellpartikel und noch vorhandene ganze Zellen abzutrennen.
Der Überstand wurde einer dreistündigen Ultrazentrifugation (Beckman L-5-65, 45 000 UpM im Rotor 65 Ti) unterzogen.
Das Sediment enthielt die Chromatophoren, während die lösliche Phase in der Regel frei von Zellpartikeln war.

3.2 Enzymatische Nachweismethoden

3.2.1 ATP - Sulfurylase

Zum Nachweis der ATP - Sulfurylase während der verschiedenen Anreicherungsschritte wurde die Bildung von ATP aus APS und PP_i spektralphotometrisch bei 340 nm erfaßt.
Der Reaktionsansatz enthielt die folgenden Komponenten:

Tris - HCl Puffer, pH 7.6		5	mM
Glukose		20	mM
$Mg\ Cl_2 \times 6\ H_2O$		2	mM
NADP		1	mM
$Na_4P_2O_7$		1	mM
Hexokinase		3	E
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase		3	E
Na_2APS		0.5	mM
Enzym +			
H_2O dest	ad	1	ml

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzymextraktes zum Reagenzienansatz gestartet. Die NADP - Bildung wurde spektralphotometrisch bei 340 nm verfolgt.
Die Menge an umgesetztem ATP ist äquimolar zur Menge an geformten NADP.
Eine Enzymeinheit wurde als die Extraktmenge definiert, die den Umsatz von 1 µmol APS $\times$ min^{-1} katalysiert.

Um eine mögliche Beeinflussung der im oben beschriebenen Testsystem enthaltenen Hilfsenzyme ausschließen zu können, wurden bei Aufnahme der Enzymkinetiken Endpunktbestimmungen vorgenommen, in denen die Menge an produziertem ATP bestimmt wurde.

Das verwendete Testsystem enthielt 50 mM Tris - HCl Puffer, pH 7.6, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $Na_4P_2O_7$, 1 mM APS und die zu untersuchende Extraktmenge in einem Gesamtvolumen von 2 ml.
Die Reaktion wurde durch Enzymzugabe gestartet. Nach 2 min wurde die Reaktion durch Kochen terminiert und ausgeflocktes Protein durch Zentrifugation entfernt.
Aliquots des proteinfreien Überstandes wurden zur Bestimmung des

ATP - Gehaltes wie unter (II, 2.1) beschrieben herangezogen.

3.2.2 ADP - Sulfurylasen

Während der Anreicherungsschritte wurde die spezifische Aktivität im kontinuierlichen spektralphotometrischen Test ermittelt.

Die ADP - Sulfurylase katalysiert die folgende Reaktion:

$$APS + P_i \longrightarrow\!\!\!\!\!\rightleftharpoons ADP + SO_4^{2-}$$

Das entstehende Reaktionsprodukt ADP wird indirekt über die Hilfsenzyme Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase über die Oxidation von NADH nachgewiesen.
Da die Menge an umgesetztem APS der Menge an gebildetem NAD^+ äquimolar ist, kann über die Bestimmung der Extinktionsabnahme bei 340 nm der Reaktionsumsatz ermittelt werden.

Die Messungen wurden bei 25°C in einem Zeiss PM 4 und einem Lichtweg von 1cm in 1 ml Glasküvetten durchgeführt.

Tris - HCl Puffer, pH 7.6		50	mM
APS		1	mM
K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7.6)		1	mM
PEP (in Glycerin)		0.4	mM
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$		1	mM
NADH		0.12	mM
Pyruvatkinase		10	E
Lactatdehydrogenase		10	E
Extrakt und H_2O dest	ad	1	ml

Mit Ausnahme des APS wurde der vollständige Reaktionsansatz bei 25°C bis zur Einstellung eines stabilen Gleichgewichtes vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von APS gestartet wurde.

Eine Enzymeinheit wurde als die Extraktmenge definiert, die den Umsatz von 1 µmol APS x min^{-1} hervorruft.

Die enzymkinetischen Untersuchungen am gereinigten Extrakt wurden über Endpunktbestimmung vorgenommen.

Der Reaktionsansatz war identisch mit dem des photometrischen Testsystems; lediglich die Hilfsenzyme fehlten in diesem Ansatz.

Zwei min nach Start der Reaktion durch Enzymzugabe wurde der Katalysevorgang durch Kochen abgestoppt.
Das ausgeflockte Material wurde durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge entfernt.
Aliquots des Überstandes wurden zur ADP - Bestimmung (II, 2.2) verwendet.

3.2.3 Adenylatkinase

Während der Anreicherungsschritte wurde die Aktivität der Adenylatkinase im kontinuierlichen spektralphotometrischen Test bestimmt.

Um die Produktion von ADP aus ATP und AMP photometrisch erfassen zu können, wurde die Reaktion mit der Pyruvatkinase und der Lactatdehydrogenase gekoppelt, wobei wiederum die Oxidation des NADH als Meßgröße festgehalten wurde.
Der Reaktionsansatz war identisch mit dem unter (II, 3.2.3) beschriebenen, doch wurde das APS im Testansatz durch 1 mM AMP und 1 mM ATP ersetzt.

Bei kinetischen Untersuchungen wurde auf die Methode der Endpunktbestimmung zurückgegriffen.
In ein Reagenzglas wurde der unter (II, 2.1) aufgeführte Reaktionsansatz einpipettiert.
Zu definierten Zeitpunkten (2, 4 und 6 min nach Start der Reaktion durch Enzymzugabe) wurden die Ansätze einer Meßreihe durch Einbringen in ein kochendes Wasserbad abgestoppt.
Ausgefälltes Protein wurde abzentrifugiert und mit einem Aliquot des Überstandes wurden Bestimmungen zum ATP - Gehalt (II, 2.1) durchgeführt.

Eine Enzymeinheit wurde als die Extraktmenge definiert, die die Bildung von 1 µmol ATP x min^{-1} bewerkstelligte.

3.2.4 Pyrophosphatase

Die anorganische Pyrophosphatase wurde nach einem modifizierten Testansatz von Akagi und Campbell (1963) bestimmt.
Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM eines Tris-HCl Puffers vom pH 9.0, 2 µmol $MgCl_2$, 2 µmol $Na_2P_4O_7$, eine definierte Extraktmenge und H_2O bidest., so daß das Gesamtvolumen des Testansatzes 0.95 ml betrug. Mit Ausnahme des Substrates $Na_2P_4O_7$ wurden alle Bestandteile des Testansatzes für 5 min bei 25°C vorinkubiert, bevor die Reaktion gestartet wurde. Nach 2, 5, 7 und 10 min wurden die Reaktionen der jeweiligen Meßreihen durch Zugabe von 50 µl einer 20 prozentigen TCA-Lösung terminiert. Ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugation (10 min bei 4000 UpM) abgetrennt und ein Aliquot des Überstandes wurde zur Bestimmung des freigesetzten Phosphates (s. 3.2.4.1) nach Taussky und Shorr (1953) verwendet. Dabei entsprach eine enzymatische Einheit der Freisetzung von 1 µmol Phosphat x min^{-1}. Als Leerwert zur Umsatzbestimmung diente ein Reaktionsansatz, der mit Ausnahme des Enzyms alle Komponenten eines terminierten Reaktionansatzes enthielt.

3.2.4.1 Phosphatnachweis

Der Nachwies für Phosphat erfolgte in einem colorimetrischen Test nach Taussky und Shorr (1953). In phosphatfrei gespülte Reagenzgläser wurden 0.5 ml Probenmaterial (maximale Phosphatkonzentration 0.45 µmol), 0.5 ml einer 10% igen TCA-Lösung und 0.5 ml Taussky Shorr Reagenz pipettiert und vermischt. Nach 5 min wurde die auftretende Blaufärbung der Lösung gegen einen Reagenzienleerwert bei 578 nm gemessen.
Die in der Probe enthaltene Phosphatmenge wurde einer Eichgeraden entnommen, die mit getrocknetem KH_2PO_4 unter identischen Testbedingungen aufgenommen worden war. Die Eichgerade verlief bis 0.4 µmol Phosphat linear, wobei eine Extinktion von 0.6 erzielt wurde.

Taussky-Shorr Reagenz

Lösung A: 50 g $(NH_4)_6MoO_{24} \times 4\ H_2O$ wurden in 400 ml 10 N H_2SO_4 suspendiert. Anschließend wurde mit H_2O bidest auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung konnte in einem

lichtgeschütztem Behältnis über einen Zeitraum von mehreren Monaten gelagert werden.

Lösung B: 2.5 g $Fe(II)SO_4 \times 7\ H_2O$ wurden in 10 ml Lsg. A suspendiert und mit H_2O bidest auf ein Gesamtvolumen von 50 ml gebracht. Lösung B entspricht dem für den Phosphattest benötigten Reagenz. Es wurde kurz vor Testbeginn frisch angesetzt und bis zum Einsatz lichtgeschützt aufbewahrt.

3.2.5 APS-Kinase

3.2.5.1 Qualitativer Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie

Der Nachweis für die APS-Kinase sollte durch die qualitative Bestimmung des Reaktionsproduktes PAPS mittels Dünnschichtchromatographie erfolgen. Zu diesem Zweck wurden folgende Substanzen in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert:

100 mM Tris-HCl, pH 8.5
10 mM Na_2ATP
10 mM Na_2SO_4
10 mM $MgCl_2$
2 E ATP-Sulfurylase
1 E Pyrophosphatase
Extrakt und H_2O dest ad 2 ml

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Extraktes gestartet. Die Ansätze wurden zu verschiedenen Zeiten (nach 2, 5, 10, 15 und 20 min) durch ein 1 min. Kochen terminiert; das ausgefallene Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Von dem Überstand wurden geringe Mengen (Volumen >0.5 µl) mit einer Hamilton-Spritze auf eine HPTLC-Platte in einem Probenabstand von ca. 0.8 cm aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen dienten APS, PAPS, ADP und ATP.Die Präparation des Chromatographiegefäßes, das verwendete Laufmittel und die Chromatogrammauswertung und Entwicklung waren identisch mit den unter 2.3 beschriebenen Chromatographiebedingungen.

3.2.6 APS-Reduktase

3.2.6.1 Qualitativer Nachweis der APS-Reduktase mittels Dünnschichtchromatographie

Dieser äußerst empfindliche Test diente zum Nachweis des Reaktions-

produktes der APS - Reduktase, des Adenosin-5'-Phosphosulfates.

Der Testansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Tris-HCl, pH 7.6	50	mM
EDTA	2	mM
Na_2AMP	1	mM
Na_2SO_3	5	mM
$K_3Fe(CN)_6$	2	mM
Enzym + H_2O dest. ad	1	ml

Die Reaktion wurde durch Extraktzugabe gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Kochen terminiert und das ausgefällte Protein durch Zentrifugation aus der Probe entfernt. Mittels einer Hamilton-Spritze wurden maximal 0.5 ml des Überstandes auf die Startlinie pipettiert und mit einem Phön getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die HPTLC-Platten in ein Chromatographiegefäß gegeben, dessen Atmosphäre mit dem Laufmittelgemisch (Propanol-2, Ammoniak (33%) und H_2O dest im Verhältnis von 6:3:1) abgesättigt war.
Nach etwa halbstündiger Laufzeit erfolgte die Auswertung des Chromatogrammes bei 258 nm.
Die Identifizierung des Reaktionsproduktes erfolgte anhand des ermittelten R_f-Wertes oder durch direkten Vergleich mit den Referenzsubstanzen.

3.2.6.2 Ferricyanid-gekoppelter Test (nach Peck, 1961)

Der Reaktionsansatz enthielt 0.2 mM Na_2AMP, 1 mM $K_3Fe(CN)_6$, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 2 mM Na_2SO_3, Extrakt und H_2O dest in einem Gesamtvolumen von 1 ml.
Zur Herabsetzung der Autoxidation der Sulfitlösung wurde die Substanz in einer 5 mM EDTA-Lösung suspendiert und erst kurz vor Messungsbeginn angesetzt.
Das Ferricyanid dient im Reaktionsansatz als künstlicher Elektronenakzeptor. Als Maß für die Enzymaktivität wird die bei Oxidation auftretende Extinktionsabnahme bei 420 nm bestimmt, da Ferricyanid im Gegensatz zur Ferro-Form über ein Extinktionsmaximum bei 420 nm verfügt.
Zunächst wurde die nichtenzymatische Oxidation des Sulfits bestimmt, dann die Aktivität einer eventuell vorhandenen Sulfit:akzeptor:oxidoreduktase (Zugabe von Extrakt zum Reaktionsansatz), bevor durch

Addition von Sulfit die Reaktion der APS - Reduktase gestartet wurde.

3.2.6.3 APS - Reduktasetest mit Cytochrom c als Elektronenakzeptor

Das verwendete Testsystem wurde 1971 von Trüper und Rogers entwikkelt. Als Elektronenakzeptor dient Cytochrom c, wobei die Zunahme der Extinktion bei 550 nm gemessen wird.

Testansatz:	Tris - HCl Puffer, pH 9	6.6 µmol
	AMP (pH 7.0)	0.1 µmol
	Cytochrom c	0.1 µmol
	Extrakt und H_2O dest	ad 1.0 ml

Der molare Extinktionskoeffizient für Cytochrom c aus Pferdeherz beträgt 8.0 cm^2/mol. Zwei µmol Cytochrom c_{red} entsprechen 1 µmol gebildetem APS.

3.2.7 Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase

Bei dem Testansatz handelt es sich um eine Modifikation des APS-Reduktasetestsystems.
Das Reaktionsgemisch enthielt 1 µmol Na_2SO_3, 0.1 µmol Na_2AMP (pH 7), 0.1 µmol $K_3Fe(CN)_6$, 50 mM Tris - HCL Puffer, pH 9.0, Enzym und H_2O dest in einem Gesamtvolumen von 1 ml.
Die Bestandteile wurden in eine Glasküvette pipettiert und bei 25°C vorinkubiert. Hatte sich ein stabiler Leerwert eingestellt, wurde die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet und die Veränderung der Extinktion bei 420 nm registriert.
Eine enzymatische Einheit wurde als die Extraktmenge definiert, die die Umwandlung von 1 µmol Sulfit in ein µmol Sulfat katalysierte.
Wurde Cytochrom c als Elektronenakzeptor verwendet, wurde der pH - Wert des Reaktionsansatzes auf pH 7.8 herabgesetzt und der Elektronenakzeptor in einer Menge von 0.05 µmol zugesetzt.
Die Messungen wurden bei 550 nm durchgeführt.

4 Anreicherungsverfahren

4.1 Hitzefällungen

Der Enzymextrakt wurde in kleinen Mengen in Zentrifugenröhrchen gegeben und bei verschiedenen Temperaturen in einem Wasserbad über bestimmte Zeitintervalle inkubiert. Anschließend wurden die hitzebehandelten Extrakte bis zu ihrer Aktivitätsbestimmung im Eisbad aufbewahrt. Da die Enzyme aufgrund ihrer Struktur bei unterschiedlichen Temperaturen koagulieren resp. irreversibel geschädigt werden, besteht bei größerer Hitzeverträglichkeit des untersuchten Enzyms die Möglichkeit, andere Begleitproteine mit geringerer Temperaturverträglichkeit über eine Denaturierung abzutrennen.

4.2 Ammoniumsulfatfällung nach Warburg und Christian (1941)

Die Ammoniumsulfatfällung wurde gemäß den Angaben von Warburg und Christian im Eisbad bei $0^{o}C$ durchgeführt. Das Aussalzen der Proteine erfolgte in meheren Fällungsschritten. Die für die einzelnen Schritte benötigten Ammoniumsulfatmengen wurden einem Nomogramm der oben erwähnten Publikation entnommen. Nach erfolgter langsamer Zugabe des fein gemahlenen Ammoniumsulfates unter stetigem Rühren wurde das gefällte Protein nach ungefähr 1 Stunde durch Zentrifugation (10 min bei 15 000 UpM) in einer Sorvall RC-5 sedimentiert und in einem geringen Volumen des jeweiligen Arbeitspuffers resuspendiert.

4.2.1 Rückextraktion nach erfolgter $(NH_4)_2SO_4$-Fraktionierung

Da Proteine aufgrund lokal auftretender Überschreitung des Löslichkeitsproduktes unspezifisch aus einer Proteinlösung präzipitiert werden können, wurde bei ungenügender Effizienz der Ammoniumsulfatfällung die Methode der Rückextraktion angewendet.
Dieser Methode liegt die Tatsache zugrunde, daß der Lösungsvorgang aus einem Präzipitat ein sehr spezifischer Vorgang ist und weniger Proteine im extrahierten Niederschlag zurückbleiben.
Demzufolge wurde der Proteinextrakt zuerst einer fraktionierten Fällung unterworfen, wobei die Endkonzentration des letzten Fäl-

lungsschrittes über dem Löslichkeitsprodukt des betreffenden Enzyms lag. Anschließend wurde das Enzym aus dem Niederschlag durch eine stufenweise Herabsetzung der Lösungskonzentration extrahiert.

4.3 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration diente zur schnellen und schonenden Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen bei gleichzeitiger Abtrennung niedermolekulrer Bestandteile.
Dabei wurden 2 Kammersysteme unterschiedlichen Volumens verwendet: eine Kammer mit 50 ml Fassungsvermögen und eine mit 10 ml. Die Filtration erfolgte im Eisbad unter 0.7 atü N_2-Druck mit einem Filter der Ausschlußgröße 10000 Dalton.

4.4 Säulenchromatographische Methoden

Alle Säulenchromatographien wurden bei 4°C im Gillson-Kühlschrank durchgeführt.

4.4.1 Gelfiltration mit Sephadex G 25, G 75, G 200 und S 300

Das aufgeführte Säulenmaterial wurde zur Abtrennung niedermolekularer Bestandteile, zur Reinigung und zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet.

Die Hydratisierung der Gele erfolgte im kochenden Wasserbad (G 25 für 1h, G 75 für 3h, G 200 und S 200 für 5h).
Zum Entfernen der fines wurde das gequollene Gel in einem vierfachen Überschuß des Elutionspuffers suspendiert und in einen Meßzylinder gegeben. Nachdem sich ca. 90% des Gels abgesetzt hatten, wurde der Überstand mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Eine zweimalige Wiederholung des Vorganges befreite das Säulenmaterial in der Regel vollständig von fines, die zur Verminderung der Durchflußgeschwindigkeit beitragen.
Unmittelbar vor dem Gießen der Säule wurde das Gel über eine Wasserstrahlpumpe entgast. Das gereinigte und entgaste Gel wurde anschließend auf die Arbeitstemperatur herabgesetzt, um eine Kontraktion oder Ausdehnung des Gelbettes und damit eine Unregelmäßigkeit in der Gelpackung zu verhindern.

Das Gel wurde über ein mit der Säule verbundenes Vorratsgefäß langsam an einem Glasstab entlang bei geschlossenem Ausgang in die Säule eingelassen.
Bei Verwendung von Sephadex G 25 läßt man das Gel für 5 - 10 min absitzen, bevor der Säulenausgang geöffnet wird. Bei den übrigen Gelen wurde die Absetzphase auf 15 min verlängert, bevor der Säulenausgang geöffnet wurde. Während sich das Gelbett bildet, wird durch langsames Absenken des Auslaufes der hydrostatische Arbeitsdruck eingestellt. Er beträgt bei einer Sephadex G 75 50 cm, bei einer Sephadex G 200 10 cm und bei einer S 200 75 cm H_2O.
Zur Stabilisierung des Gelbettes wurde mindestens das vierfache Säulenvolumen an Elutionspuffer durch die Säule geschickt. Um die Säulen vor dem Trockenlaufen zu schützen, wurde am Auslauf einer jeden Säule eine Sicherheitsschleife eingebaut.
Diente das Säulenmaterial lediglich zum Abtrennen niedermolekularer Bestandteile, konnten etwa 20 - 25% des Säulenvolumens an Extrakt aufgetragen werden, für die Isolierung von Enzymen wurde das Probevolumen auf 1 - 3% verringert.
Je nach Aufgabenstellung wurden verschiedene Säulen verwendet. Beim Entsalzen wurden Säulen mit großem Durchmesser und geringer Länge verwendet, um die Fließgeschwindigkeit zu erhöhen, während bei einer Trennung von Makromolekülen das Verhältnis von Länge zur Höhe von 1:8 auf 1:90 heraufgesetzt wurde. Zur Verminderung des Wandeffektes wurden nie Säulen verwendet, deren Durchmesser > 1 cm betrug.
Zur Bestimmung des Molekulargewichtes mittels Gelfiltration wurden mit den betreffenden Säulen Eichgeraden unter Verwendung der Eichproteine (Boehringer, Combithek II) erstellt.
Als Eichproteine dienten:

Cytochrom c	MG= 12500	Eichmenge	5 mg
Chymotrypsinogen	MG= 25000	"	5 mg
Albumin aus Hühnerei	MG= 45000	"	5 mg
Albumin aus RSA	MG= 67000	"	5 mg
Aldolase	MG=158000	"	4 mg
Katalase	MG=240000	"	3 mg
Ferritin	MG=450000	"	1 ml

Die Eichproteine wurden in jeweils 1.5 ml des betreffenden Eichpuffers suspendiert und mittels einer Enzympipette vorsichtig auf die trockene Geloberfläche aufgetragen, um eine einseitige Beschä-

digung der Geloberfläche zu verhindern und einer unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit der Substanz im Gel vorzubeugen. Nach Einsinken des Eichproteins in das Gel wurde die Säule an das Pufferreservoir angeschlossen.

Zur Bestimmung des Leervolumens wurden 1 ml einer Dextranblau-Lösung verwendet. Zur weiteren Säuleneichung wurden mindestens 4 Eichläufe durchgeführt, wobei maximal 2 Eichproteine zugleich aufgetragen wurden. Sie unterschieden sich in ihrem Molekulargewicht deutlich voneinander, so daß ihr Elutionsvolumen (V_e) anhand ihrer Proteinabsorption eindeutig bestimmt werden konnte. Zur Erstellung der Eichgeraden wurde der Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichtes des Eichproteins gegen den Quotienten aus dem Elutionsvolumen (V_e) und dem Leervolumen (V_o) aufgetragen.

4.4.2 Ionenaustauschchromatographie

Als DEAE-Cellulose wurde das vorgequollene Gel Whatman DE 52 verwendet. Da die Austauscher jedoch einem oxidativen Abbau unterliegen, wurde die gelöste Cellulose zur Entfernung von Fremdstoffen einem erneuten Waschvorgang (sukzessives Spülen mit H_2O dest, 0.5 N HCl und 0.5 M Tris-Lösung) unterzogen.
Zur Kapazitätssteigerung und zur Erhöhung des Auflösevermögens des Anionenaustauschers wurden alle Diethyaminoethylgruppen in ihre geladene Form überführt, um ein maximales Aufquellen und Exponieren der geladenen Gruppen zu ermöglichen. Dieses Precycling wurde den Angaben von Neumeier (1981) zufolge durchgeführt.
Da DEAE-Cellulose leicht Schwermetalle bindet und zumindest APS-Reduktase und ADP-Sulfurylase über funktionelle SH-Gruppen verfügen, wurde der Austauscher nach erfolgtem Precycling in dem 10fachen Matrixvolumen einer 10 mM EDTA-Lösung gewaschen.
Der vollständig gequollene und überarbeitete Austauscher wurde zur Erhöhung der Fließgeschwindigkeit und zur Verbesserung des Auflösevermögens von den fines durch wiederholtes Dekantieren befreit.

Unter Verwendung eines Büchner-Trichters wurde das Gel mit dem Arbeitspuffer gewaschen, bis der geforderte pH-Wert des Puffers erreicht war. Das sich anschließende Gießen der Säule erfolgte unter etwas erhöhtem Arbeitsdruck(40 cm H_2O). Um eine Verminderung des Auflösevermögens zu vermeiden, wurden kurze, breite Säulen

Säulen verwendet, um die durch Diffusion hervorgerufene qualitative Abnahme des Reinigungserfolges so gering wie möglich zu halten. Das Volumen des Austauschers war jedoch in allen Fällen mindestens 3 - 5 x größer als die Menge, die zur Bindung der Proteine benötigt wird.

Die Proteinlösung wurde durch Pufferaustausch an einer Sephadex G 25 in den Startpuffer überführt und auf den Ionenaustauscher aufgetragen. Anschließen wurde die Säule mit dem zweifachen Bettvolumen des Startpuffers gewaschen, um nichtbindende Proteine zu eluieren.
Die Ionenstärke des Waschpuffers wurde durch Anlegen eines Stufengradienten schrittweise heraufgesetzt, bis die gewünschte Molarität des Arbeitspuffers erreicht war. Die eigentliche Elution der untersuchten Enzyme erfolgte in der Regel mit einem linearen Salzgradienten; dieser wurde mit dem Gradientenmischer GM-1 der Fa. Pharmacia eingestellt. Die Fraktionen wurden automatisch gesammelt und analysiert. Als Meßgröße der Proteinkonzentration wurde die Absorption der Fraktionen bei 260 + 280 nm bestimmt. Fraktionen mit hoher Enzymaktivität wurden vereinigt und einem weiteren Anreicherungsschritt unterworfen.

4.4.3 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie der Adenylatkinasen aus T.denitrificans und C.warmingii wurde unter Verwendung der 5'AMP Sepharose 4B der Fa. Pharmacia durchgeführt. Das vorgequollene Gel wurde in einem Büchner-Trichter mit einem 20 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.8 und 1 mM $MgCl_2$ äquilibriert und anschließend in eine Säule (Sv: 1.4 x 14 cm) gegossen.
Nach dem Auftragen des vorgereinigten Extraktes (Proteinkonzentration unter 5 mg/ml zur Ausnutzung des Effektes der sich verstärkenden Effektivität), erfolgte das Entfernen des nichtbindenden oder weniger fest an die Matrix bindenden Proteines durch Elution mit einer 100 mM NaCl-Lösung, die in dem Arbeitspuffer suspendiert worden war. Die Adenylatkinasen wurden bei einer NaCl- Konzentration von 0.5 M aus der Säule bei herabgesetzter Fließgeschwindigkeit (30 ml/h) eluiert.

4.5 Disc-Gelelektrophorese nach Maurer (1971)

Um Aussagen bezüglich der Reinheit der hergestellten Enzympräparate machen zu können, wurde eine Proteinauftrennung mittels der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese vorgenommen. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Angaben von Maurer (1971) unter Verwendung eines Gerätes der Firma Desaga (Heidelberg).

Technische Daten:

Verwendetes Gelsystem : Nr. 1a, pH 8.9; 7% Acrylamid

Elektrodenpufferlösung : Tris-Glycin (0.6g Tris +28.8g Glycin ad 1l H_2O dest.) pH 8.3

Länge der Gelröhrchen : 5 x 90 mm

Auf die Gelröhrchen wurden die Proben (maximaler Proteingehalt 50 µg) vorsichtig mit einer Eppendorf-Pipette aufgetragen. Zur Unterschichtung des über der Geloberfläche befindlichen Puffers war der Extrakt vor Zusatz mit einer etwa 40%igen Saccharoselösung beschwert worden.

Um die Lauffront zu markieren, wurde dem Gemisch 20 µl Bromphenolblau zugesetzt. Die Betriebsstromstärke des Gerätes richtete sich nach der Anzahl der Teströhrchen: während der ersten 2 min der Elektrophorese betrug die verwendete Stromstärke 1 mA/Röhrchen, danach wurde sie auf 5 mA heraufgesetzt. Die angelegte Betriebsspannung betrug 200 Volt.

Die Elektrophorese wurde abgebrochen, wenn die Markerbande ca. 1cm vom unteren Rand des Gelröhrchens entfernt war.

Zur Anfärbung der im Gel vorhandenen Proteine diente eine 0.25%ige Coomassie-Brilliant-Blue Lösung die 45 ml Methanol, 9 ml Eisessig und H_2O dest in einem Gesamtvolumen von 100 ml enthielt.

Die Fixierdauer betrug 30 min. ; dann wurde das Gel in eine Entfärbelösung gegeben. Der Entfärber setzte sich aus 50 ml Ethanol, 75 ml Eisessig und 875 ml H_2O demin. zusammen. Die Gele wurden nach mehrmaligem Auswechseln der Lösung über Nacht im Entfärber belassen. Die Konservierung erfolgte in einer 7%igen Essigsäure.

4.6 Nachweis der APS - Reduktase im Gel (nach Peck et al., 1965; modifiziert von Skyring und Trudinger, 1973)

Die entwickelten Gele wurden zunächst in einer 0.4 mM Mercaptoethanollösung vorinkubiert, bevor sie in einen frisch angesetzten Reaktionsansatz eingebettet wurden. Dieser enthielt 2 mM AMP, 0.5 mM Na_2SO_3, 0.7 mM $K_3Fe(CN)_6$, die in 100 mM Tris-HCl vom pH 7.4 gelöst waren.
In Parallelansätzen fehlten in dem Reaktionsansatz Sulfit und AMP. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C; dann wurden die Gele in H_2O bidest gewaschen und mit 10 mM $FeCl_3$ versetzt, das in einer 1 N HCl-Lösung suspendiert worden war.
Die Nachweisreaktion galt als abgeschlossen, sobald sich blaue Banden bildeten.

4.7 Analytische Elektrofokussierung in Polyacrylamidgelen

Die zur Proteinanalyse eingesetzte Methode zeichnete sich durch eine hohe Auflösung bei gleichzeitiger starker Konzentrierung der aufgetragenen Proteinbestandteile aus. Über die analytische Elektrofokussierung sollte der IEP des betreffenden Enzyms ermittelt resp. Aussagen über dessen Reinheitsgrad getätigt werden.
Bei diesem Verfahren wird ein von der Anode zur Kathode ansteigender pH-Gradient erzeugt. Jede der im aufgetragenen "Gemisch" enthaltenen Substanzen wandert während der Elektrofokussierung bis zu der Stelle, deren pH dem IEP entspricht. Dort trägt die Testsubstanz keine Außenladung mehr, sie verhält sich elektrisch neutral und kann im angelegten Gradienten nicht mehr wandern.
Die isoelektrische Fokussierung wurde mit LKB - Ampholine PAG-Platten gemäß der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Geräte und Chemikalien:
LKB 2117 Multiphor
LKB 2103 Power Supply
LKB Ampholine PAG-plates (LKB Kat. Nr. 1804 - 101)
Anodenlösung : H_3PO_4, 1M
Kathodenlösung: NaOH, 1M
Entfärber : 500 ml Ethanol + 160 ml Eisessig werden mit H_2O dest auf 2 l verdünnt

Färbelösung : 0.46g Coomassie-Brilliant Blue R 250, gelöst in 400 ml H_2O dest
Konservierer : 40 ml Glycerin in 400 ml Entfärbelösung

Die Experimente wurden bei 10°C durchgeführt. Die angelegte Spannung wurde während der Dauer des Experimentes über eine Kontrollvorrichtung am Gerät verfolgt und während des Laufes anhand einer vom Hersteller vorgegebenen Tabelle laufend korrigiert.
Über das Probenaufgabepaper wurden zwischen 5 und 15 µl der entsalzten Probe an definierten Stellen auf die Trägerplatte gegeben. Nach 1.5h wurde das Experiment gestoppt, die PAG-plate auf den Gelbetträger der Anfärbeschale gelegt und 1h mit der Fixierlösung behandelt, dann 5 min mit Entfärber gewaschen, um anschließend bei 60°C in der vorgewärmten Färbelösung angefärbt zu werden.
Das Entfärben erstreckte sich über mehrere Stunden unter häufigem Wechsel der Färbebäder.
Die aufgetragenen Proteine stellten sich als blaue Banden dar.
Der IEP wurde anhand einer experimentell aufgestellten pH-Gradientenkurve oder durch direktes Auflegen (bei gefärbten Proteinen) einer Oberflächenelektrode ermittelt.

5 Sonstige Methoden

5.1 Proteinbestimmung von löslichen Extrakten nach Lowry et al. (1951)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von angereicherten, pigmentfreien Enzympräparaten wurde ein Bestimmungsansatz mit folgeden Reagenzien verwendet:

Lösung A:	Na_2CO_3	20	g
	Natriumtartrat	0.2	g
	NaOH	4	g
	H_2O dest ad	1	l
Lösung B:	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0.5	g
	H_2O dest	100	ml

Lösung C:	Lösung A	:	50 ml
	Lösung B	:	1 ml
Lösung D:	Folin-Ciocalteus-Reagenz	:	15 ml
	H_2O dest	:	21 ml

Die Lösungen C und D dürfen erst kurz vor Testbeginn angesetzt werden, während die Lösungen A und B über mehere Monate in abgedunkelten Behältnissen gelagert werden können.

Zu 1 ml der verdünnten Probe wurden 5 ml Lösung C gegeben, gut durchmischt und nach 10 min mit 0.5 ml Lösung D versetzt. Nach erneutem Durchmischen wurde die Probe bei 30°C für 30 min inkubiert, bevor sie bei 660 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve, die mit Rinderserumalbumin unter identischen Bedingungen aufgenommen worden war. Dabei entsprach einer Extinktion von 0.1 einer Proteinkonzentration von 29.7 µg pro Ansatz.

5.2 Ionenleitfähigkeitsmessung

Die Abtrennung der Proteine von den Salzen mit Hilfe einer Sephadex G-25 Säule wurde durch die Messung der Ionenleitfähigkeit überwacht. Dazu diente eine Durchflußmeßzelle der Firma WTW vom Typ LDM/S.

5.3 Aufnahme der Spektren

Spektren wurden in einem Beckman Spektralphotometer Acta M 6 gegen den jeweiligen Puffer bei Raumtemperatur aufgenommen.

5.4 Identifizierung der Cytochrome

Die Cytochrome wurden aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften identifiziert, wobei die Wellenlänge des γ-Absorptionsmaximums als Hauptkriterium der Namensgebung galt. Die Reduktion der Cytochrome erfolgte durch Zugabe von Dithionit, die Oxidation durch Zugabe eines Ferricyanidkörnchens.

5.5 Aufnahme eines alkalischen Pyridinspektrums

Zur eindeutigen Identifizierung des Cytochrom-Typs wurde ein alkalisches Pyridinspektrum gefahren.
Prinzip der Messung: während bei einem Cytochrom vom c-Typ das kovalent gebundene Mesohäm zusammen mit der Proteinkomponente denaturiert, wird das Protohäm von seinem Protein bei einem Cyto-

chrom vom b-Typ abgetrennt und in die organische Phase überführt.

Dazu wurde das jeweilige Cytochrom im Eisbad unter Zufügen von 1N HCl auf einen pH von 2 eingestellt und dann mit dem dreifachen Volumen an eiskaltem Aceton (vorgekühlt bei -18°C) versetzt.
Das Aceton-Wassergemisch wurde im Stickstoffstrom von dem Sediment abgetrennt. Letzteres wurde anschließend in eine geringe Menge eines alkalischen Pyridingemisches (0.2 N NaOH und Pyridin im Verhältnis von 1:3) überführt.
Von dieser Lösung wurde ein Spektrum gegen den entsprechenden Reagenzienleerwert aufgenommen.

5.6 Bestimmung des Redoxpotentials

Die Bestimmung des Redoxpotentials erfolgte in Anlehnung an die von Dutton (1978) beschriebene Methode.
Die Redoxtitration erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei einem pH von 7.0 und konstanter Temperatur (23°C) in einer Quarzküvette, wobei dem Reaktionsansatz unter stetigem Rühren über eine Mikrospitze kleine Mengen einer 25 mM $K_3Fe(CN)_6$ resp. einer 10 mM $Na_2S_2O_3$-Lösung zugefügt wurden.
Die Messungen zum Redoxpotential erfolgten an einem PGM 63 Research pH Meter (Radiometer Kopenhagen), das mit einer Platin- und Kalomelelektrode ausgestattet war. Das Redoxpotential wurde anschließend gegen eine H_2-Elektrode (249 nm) umgerechnet.
Der Oxidationszustand der Proteine wurde in einem Beckman Acta M 6 nach Einstellen der Reaktinsgleichgewichtes registriert.
Die folgenden Redoxmediatoren wurden verwendet:

1.	40 µl	2 Methy-1,4 Naphtochinon	20 mM
2.	5 µl	2 Hydroxy-1,4 Naphtochinon	5 mM
3.	20 µl	Durochinon	20 mM
4.	10 µl	Diaminodurol	20 mM
5.	5 µl	Phenazinmethosulfat	20 mM
6.	5 µl	Ethosulfat	20 mM
7.	10 µl	1,2 Naphtochinon	50 mM
8.	10 µl	TMPD	50 mM
9.	20 µl	Chinhydron	50 mM

Die Substanzen wurden mit Ausnahme von (6) in Ethanol gelöst.

Phenazinmethosulfat wurde in H_2O dest suspendiert und bis zur Verwendung lichtgeschützt aufbewahrt.

Der komplette Reaktionsansatz wurde ständig von sauerstoffreiem Stickstoff durchperlt. Nach erfolgter Reduktion durch Zugabe von Dithionit und der Einstellung des Gleichgewichtes wurde das Redoxpotential schrittweise durch Zugabe kleinster Mengen an Ferricyanid stetig verändert.
Nach jeder Addition des Titriermittels wurde das Redoxpotential über ein Millivolt-pH Meter bestimmt. Die Reversibilität der Reaktion wurde nach erfolgter Reoxidation durch Rücktitration überprüft.
Das Mittelpunktpotential wurde durch Auftragen der Extinktionsdifferenz (A/A_{max}) gegen das ermittelte Redoxpotential bestimmt.
Die experimentell ermittelte Ferricyanidtitrationskurve wurde mit den theoretisch möglichen Werten (unter Berücksichtigung des Mittelpunktpotentials)für n=1 und n=2 verglichen, die sich aus der Nernst'schen Gleichung $E=E^{o} + \frac{0.059}{n} \times \log \frac{(ox.)}{(red)}$ ergaben.

5.7 Synthese von Adenosin-5'-Phosphosulfat

Um die ADP - und ATP - Sulfurylasen unter dissimilatorischen Bedingungen untersuchen und charakterisieren zu können, war es unerläßlich, über ihr gemeinsames Substrat APS in ausreichenden Menge zu verfügen.
Da für die Ausführung der kinetischen Experimente größere Mengen an APS benötigt wurden, wurde das Nukleotid in mehreren Ansätzen synthetisiert und gereinigt. Die verwendeten Syntheseschritte waren nahezu identisch mit den von Imhoff (1980)beschriebenen.

Zur APS-Synthese diente ein Zellextrakt aus T.denitrificans, da sich dieser Organismus durch einen besonders hohen Gehalt an APS - Reduktase auszeichnet (Bowen et al. , 1965).
Für den Zellaufschluß wurde der Extrakt pro g Naßgewicht mit 3 ml 20 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.6 versetzt, homogenisiert und,wie unter 3.1 beschrieben,aufgeschlossen. Eine sich anschließende Zentrifugation in der Sorvall RC 2B sorgte für das Abtrennen gro-

ber Zellpartikel und nicht aufgeschlossener ganzer Zellen. Der erhaltene Überstand wurde zum Abtrennen niedermolekularer Bestandteile einer Gelfiltration an einer G 25 (2 x 20 cm) unterworfen. Die proteinhaltigen Fraktionen des Eluates wurden in einen Syntheseeinsatz eingebracht, der die folgenden Bestandteile beinhaltete und ein Gesamtvolumen von 100 ml umfaßte:

50 mM Tris-HCl, pH 7.6
20 mM Na_2AMP
5 mM Na_2SO_3, gelöst in 2 mM EDTA
5 mM $K_3Fe(CN)_6$

Der Syntheseansatz wurde bei 30°C in einem Wasserbad inkubiert und durch Sulfitzugabe gestartet. Die Reduktion des Ferricyanids konnte anhand der auftetenden Entfärbung überprüft werden. In Portionen von 0.5 mmol wurde dem Ansatz Ferricyanid und Sulfit hinzugefügt. Die sukzezessive Zugabe gewährleistete einen störungsfreien Ablauf der Reaktion und verhinderte eine mögliche Hemmung durch zu hohe Ferricyanidkonzentrationen.
Die Gesamtdauer des Syntheseansatzes betrug ca. 30 min. . Danach wurde die Reaktion durch Einbringen des Ansatzes in ein Eisbad terminiert. Während des Syntheseverlaufes waren dem Ansatz Proben zur dünnschichtchromatographischen Überprüfung (2.3) entnommen worden, nach deren Auswertung der Extrakt zur Abtrennung von Proteinen und des Ferrocyanids auf eine Sephadex G-25 (4.8 x 80 cm) gegeben wurde. Das Ausschlußvolumen(600 ml) wurde verworfen, bevor die Säule an einen Fraktionssammler angeschlossen wurde.
Es wurden Fraktionen von je 10 ml gesammelt. Die Identifizierung der Proteine erfolgte anhand der Extinktion bei 259 nm und durch DC-Chromatographie. Die Fraktionen mit Gehalt an APS wurden vereinigt und mittels einer Schlauchpumpe auf eine Sephadex A 25-Säule (3 x 50 cm) aufgetragen, die ebenfalls in 20 mM Tris-HCl Puffer äquilibriert worden war. Zur Entfernung der nichtbindenden Substanzen wurde die Säule mit 300 ml des Elutionspuffers durchspült, bevor die Elution des APS durch Starten eines 2l Tris-Gradienten, pH 7.6 (250 mM - 600 mM Tris-HCl) betrieben wurde.
Das APS wurde bei einer Tris-HCl Konzentration zwischen 500 + 600

mM eluiert.
Da die APS-Konzentration selbst in den Spitzenfraktionen nicht mehr als 3 mM betrug und somit den geforderten Ansprüchen nicht genügte, wurden die Fraktionen mit dem höchsten APS-Gehalt vereinigt und auf eine BIOREX 5 - Säule (2 x 32 cm) übertragen, die zuvor in 600 mM Tris-HCl Puffer äquilibriert worden war. Die Elution des APS erfolgte durch Anlegen eines Tris - Gradienten (0.6 - 1.5 M Tris-HCl, pH 7.6).
Das auf diese Weise gewonnene APS hatte maximal eine Konzentration von 13.6 mM und wurde bei einer Konzentration von etwa 1M unter den beschriebenen Bedingungen von der Säule eluiert.

6 Herkunft der Chemikalien

Firma Merck Darmstadt	Übliche Chemikalien, Reinheitsgrad p.a. ,HPTLC - Platten
Firm Boehringer Mannheim	Nucleotide, Combithek II, PK, LDH,G-6-P-DH, Myokinase, PEP
Firma Sigma München	ATP - Sulfurylase aus Bäckerhefe 3' - Nucleotidase aus Roggen
Firma Pharmacia	Alle Sephadex - und Sephacryl-Gele, Blue Sepharose 4B, Dextranblau
Firma Serva Heidelberg	Dowex 1x8 Anionenaustauscher Rinderserumalbumin Coomassie-Brilliant Blue
Firma Bio-RAD München	Bio-REX Anionenaustauscher
Sankyo Company Ltd. Tokio, Japan	Cytochrom c aus Candida crusei
Firma LKB Gräfeling	PAG-Platten, Ampholine

III Experimente und Ergebnisse

1. Orientierende Vorversuche über das Vorkommen und die Lokalisation von APS - Reduktase und aller weiteren Enzyme, die an der Energiegewinnung durch Substratphosphorylierung beteiligt sein könnten

1.1 Enzymatische Nachweise der Enzyme

Die untersuchten Organismen wurden in mehreren Parallelansätzen in 1l Schraubverschlußflaschen angezogen.
Als einzige Schwefelquelle diente dabei Thiosulfat; lediglich C. warmingii wurde statt mit $S_2O_3^{2-}$ mit Sulfid angezogen.

Nach dreitägigem Wachstum wurden die Kulturen abgeerntet und, wie unter II, 3.1 beschrieben, präparativ auf die enzymatischen Untersuchungen vorbereitet. Die Bestimmung der jeweiligen Enzymaktivität erfolgte nach den unter II, 3.2 beschriebenen Methoden.

Während bei Thiobacillus denitrificans hohe spezifische Aktivitäten für die APS - Reduktase ermittelt werden konnten, wurde das Enzym im löslichen Überstand der Ultrazentrifugation nur in Chromatium warmingii nachgewiesen.
Die dabei ermittelten Aktivitäten lagen jedoch um mehr als eine Zehnerpotenz unter den Aktivitäten der APS - Reduktase aus Thiobacillus denitrificans RT.

Da es sich bei der APS - Reduktase der Chromatiaceae um ein chromatophorengebundenes Enzym handelt und die Stärke der Membranbindung als art- bzw. stammspezifisch erachtet wird (Trüper, 1975), wurde das Sediment der Ultrazentrifugation auf das Vorhandensein eines APS-erzeugenden Enzyms untersucht.

Im dünnschichtchromatographischem Test gelang der Nachweis für eine APS - Bildung in C.minutissimum, C.warmingii und C.vinosum, während bei C.purpuratum und C.gracile dieses Enzym weder anhand seines Reaktionsproduktes APS noch am AMP-abhängigen Umsatz von Sulfit im photometrischen Test nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 1: Vorkommen möglicher an der Energiegewinnung durch Substratphosphorylierung beteiligter Enzyme im löslichen Überstand der Ultrazentrifugation

Enzym / Organismus	APS-Reduktase	ADP-Sulfurylase	ATP-Sulfurylase	Adenylatkinase
Thiobacillus denitrificans	XX	XX	XX	XX
Chromatium warmingii	-	XX	XX	XX
Chromatium vinosum	X	XX	-/X	XX
Chromatium minutissimum	-	XX	-/X	XX
Chromatium gracile	-	XX	-/X	XX
Chromatium purpuratum	-	-	-/X	XX

Zeichenerklärung:
XX deutlich meßbare Aktivität
X schwache Aktivität
-/X sehr schwache Aktivität
- keine Aktivität

Das Ergebnis war umso erstaunlicher, als zumindest für C.gracile das Vorkommen einer APS - umwandelnden ADP - Sulfurylase zweifelsfrei nachgewiesen wurde.

Bei C.purpuratum scheiterte jedoch auch der Nachweis für eine ADP - Sulfurylase, so daß dieser Organismus wohl nicht über den Mechanismus der Substratphosphorylierung verfügt, wie er 1960 für die Thiobacilli von Peck und 1971 von Trüper postuliert wurde.

Bei den kleineren Chromatiaceae wurden nur äußerst geringe Aktivitäten einer ATP - Sulfurylase entdeckt. Sie lagen in der Größenordnung von 1 mE.

In Thiobacillus denitrificans RT übertraf die Aktivität der ATP - Sulfurylase ebenso die der ADP - Sulfurylase wie in dem Vertreter der großen Chromatiaceae, C.warmingii. Bei diesen beiden Organismen konnte die Beteiligung des Enzyms am dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel sowie am Energiegewinn durch Substratphosphorylierung nicht ausgeschlossen werden.

Bei den Auswertungen der Parallelansätze wurden in jedem der untersuchten Organismen eine große Streubreite in der spezifischen Aktivität der Enzyme gemessen,so daß eine mögliche Korrelation zwischen Kulturalter und spezifischer Aktivität vermutet wurde.

In der Folge wurden mit den Testorganismen wachstumsphysiologische Untersuchungen durchgeführt, um folgende Fragen zu klären:

1. Sind die an der Substratphosphorylierung beteiligten Enzyme konstitutiv mit vergleichbaren spezifischen Aktivitäten in der Zelle vorhanden?
2. Ist die APS - Reduktase in quantitativ gut nachweisbaren Mengen nur während einer bestimmten Wachstumsphase vorhanden (mögliche Erklärung, warum in C.gracile und C.purpuratum die APS - Reduktase in den Vorversuchen nicht nachgewiesen wurde)?
3. Wie verhalten sich in T.denitrificans und C.warmingii ADP - Sulfurylase und ATP - Sulfurylase in ihren spezifischen Aktivitäten zueinander und in welchem Verhältnis stehen sie zu dem APS-produzierendem Enzym, der APS - Reduktase?

2. Wachstumsversuche

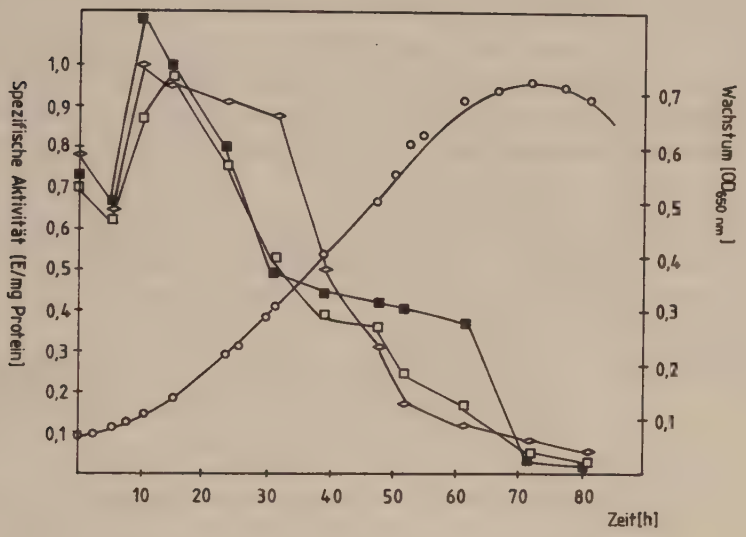
Die Anzucht der Organismen erfolgte in 20l Carboys.
Den Kulturen wurden in definierten Zeitintervallen Aliquots an Zellsuspensionen steril unter Verwendung von N_2 als Druckgas entnommen. Diese Probe wurden durch Zentrifugation zum Sedimentieren gebracht, zweimal im Aufschlußpuffer gewaschen (Tris-HCl, 50 mM, pH 7.6) und anschließend in einer geringen Menge desselben Puffers resuspendiert.

Da die entnommenen Proben nur geringe Zellmengen enthielten, wurden die Zellen durch Ultraschall in einem Bronson Sonifier model LS 75 aufgebrochen. Der Zellaufschluß erfolgte unter Verwendung eines Microtips bei einer Intensitätsstufe von 7 und wurde bei einer Stromstärke von 7 mA durchgeführt. Die Beschallzeit betrug 30 sec pro eingesetztem ml Zellextrakt.
Zellbruchstücke und nicht aufgeschlossene ganze Zellen wurden vom Extrakt durch Zentrifugation bei 10 000 UpM und einer Laufzeit von 10 min in einer Sorvall RC 2B abgetrennt.
Der so erhaltene Überstand wurde einer Ultrazentrifugation unterworfen (144 000 x g für 210 min). Überstand und Sediment der Ultrazentrifugation wurden auf Enzymaktivität untersucht.

2.1 Auswertung der Wachstumsversuche bei T.denitrificans

Die Aktivitäten von APS - Reduktase, ATP - Sulfurylase und ADP - Sulfurylase waren in starkem Maße wachstumsabhängig.
Die APS - Reduktase erreichte ihre Maximalaktivität bereits nach zwölfstündigem Wachstum.
Nach Erreichen der höchsten spezifischen Aktivität konnte im weiteren Wachstumsverlauf eine drastische Aktivitätsminderung beobachtet werden.
Da die untersuchten Enzyme fast ausschließlich im Überstand des Ultrazentrifugates nachgewiesen wurden, konnte ein direkter Vergleich zwischen den ermittelten Aktivitäten angestellt werden, zumal alle Enzymaktivitäten innerhalb der gleichen Größenordnung lagen.
Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, durchlief die ATP - Sulfurylase ihr Aktivitätsmaximum zur gleichen Zeit wie die APS - Reduktase und zudem in allen durchgeführten Parallelexperimenten zeitlich stets vor der ADP - Sulfurylase.
Nach Erreichen ihrer Maximalaktivität zeigten beide Sulfurylasen annähernd die gleichen spezifischen Aktivitäten.
Bemerkenswerter Weise lagen diese jedoch immer unterhalb der Werte, die für die APS - Reduktase für den gleichen Zeitpunkt ermittelt wurden.

Abbildung 2: Spezifische Aktivitäten von APS - Reduktase, ADP - Sulfurylase und ATP - Sulfurylase während des chemolithoautotrophen Wachstums von T.denitrificans RT auf Thiosulfat



Legenge: Proteinabsorption bei 650 nm
Spezifische Aktivität der APS - Reduktase
Spezifische Aktivität der ADP - Sulfurylase
Spezifische Aktivität der ATP - Sulfurylase

2.2 Auswertung der Wachstumsversuche bei Chromatium warmingii

Das große Chromatium unterschied sich bereits in den Vorversuchen von den kleineren Vertretern durch den Besitz einer sehr aktiven ATP - Sulfurylase, die die Aktivitäten der entsprechenden Enzyme aus C.vinosum, C.gracile, C.minutissimum und C.purpuratum um fast 3 Zehnerpotenzen überstieg.

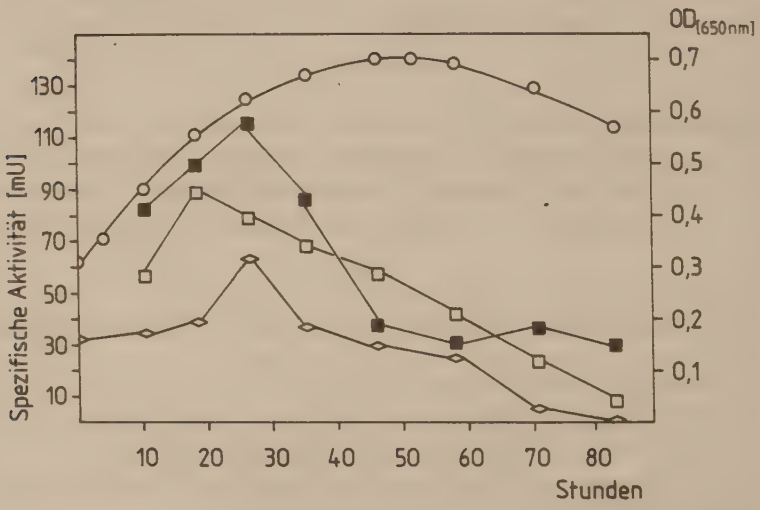
Wie schon bei T.denitrificans RT erwiesen sich die offensichtlich an der Energiegewinnung durch Substratphosphorylierung beteilig-

ten Enzyme als stark wachstumsabhängig.
Nach dem Erreichen der Maximalaktivität in der frühen exponentiellen Wachstumsphase konnte auch in C.warmingii ein rasches Absinken der spezifischen Aktivität von APS - Reduktase, ADP - Sulfurylase und ATP - Sulfurylase beobachtet werden.

Da die APS - Reduktase jedoch fest an die Chromatophoren gebunden war und eine Solvatation in der aktiven Form nicht erreicht wurde, konnten im resuspendierten Sediment nur geringe Aktivitäten des Enzyms nachgewiesen werden. Sie lagen weit unter denen für ADP - Sulfurylase und ATP - Sulfurylase.

Es ist aber anzunehmen, daß die Aktivitäten der 3 genannten Enzyme in adäquaten Verhältnissen zueinander stehen, da die APS - Reduktase beiden Sulfurylasen das Substrat stellt.

Abbildung 3: Spezifische Aktivitäten von APS - Reduktase, ADP - Sulfurylase und ATP - Sulfurylase während des photolithoautotrophen Wachstums von C.warmingii auf Thiosulfat



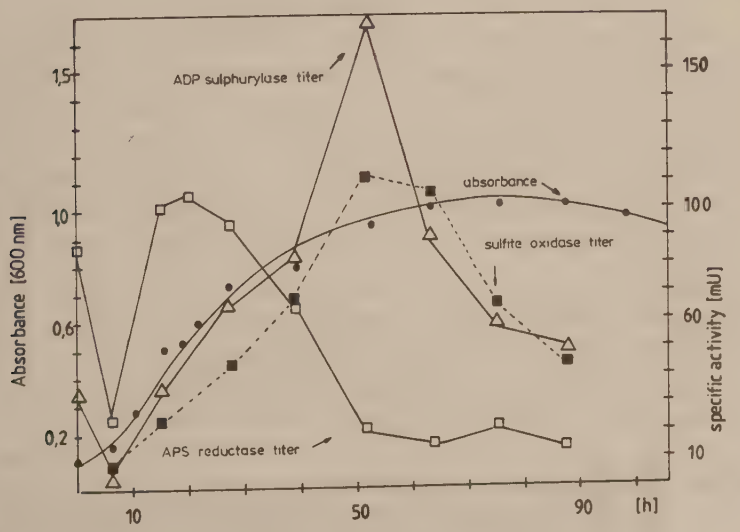
Legende:
- Proteinabsorption bei 650 nm
- Spezifische Aktivität der APS - Reduktase
- Spezifische Aktivität der ADP - Sulfurylase
- Spezifische Aktivität der ATP - Sulfurylase

Die ATP - Sulfurylase zeigt eine etwas höhere spezifische Aktivität als die ADP - Sulfurylase; beide Enzyme zeigen jedoch prinzipiell das gleiche zeitabhängige Aktivtätsverhalten im Wachstumsverlauf wie bei T.denitrificans.
Die Enzymaktivitäten liegen jedoch bei C.warmingii bedeutend niedriger als im untersuchten Vertreter der Thiobacilli.

2.3 Auswertung der Wachstumsversuche bei C.vinosum

Wie die Abbildung 4 verdeutlicht, liegt die spezifische Aktivität der ADP - Sulfurylase in einem nahezu identischen Größenbereich wie bei C.warmingii.
Auch in diesem Organismus läßt sich eine starke Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der entsprechenden Wachstumsphase erkennen.
Im Gegensatz zu T.denitrificans und C.warmingii durchlaufen APS - Reduktase und ADP - Sulfurylase ihre Aktivitätsmaxima zu deutlich verschiedenen Zeiten.

Abbildung 4: Spezifische Aktivitäten von APS - Reduktase, Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase und ADP - Sulfurylase im zeitabhängigen Wachstumsverlauf



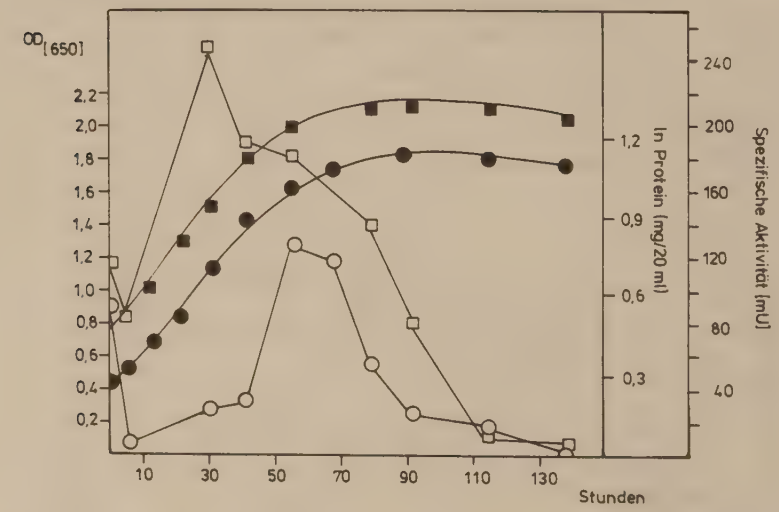
C.vinosum verfügt neben der APS - Reduktase über ein weiteres sulfitoxidierendes Enzym, die Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase.

Auch sie wird durch ein wachstumsabhängiges Verhalten charakterisiert; sie durchläuft ihr Aktivitätsmaximum etwa zur gleichen Zeit wie die ADP - Sulfurylase.

2.4 Auswertung der Wachstumsexperimente bei C.gracile

Während eine in ihren Aktivitäten von der Wachstumsphase beeinflußte ADP - Sulfurylase zweifelsfrei nachgewiesen wurde, konnte eine APS - Reduktaseaktivität während der gesammten Wachstumsdauer weder anhand ihres Endproduktes APS dünnschichtchromatographisch noch im Photometertest (wahlweise mit Ferricyanid oder Cytochrom c aus Candida) nachgewiesen werden.

Abbildung 5: Spezifische Aktivitäten der ADP - Sulfurylase und der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase in Abhängigkeit vom Wachstumsverlauf



Legende:
- Proteinabsorption bei 650 nm
- Proteinbestimmung an ganzen Zellen
- Spezifische Aktivität der ADP - Sulfurylase
- Spezifische Aktivität der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase

Wie C.vinosum verfügt C.gracile über eine Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase.
Die Aktivitäten des Enzyms sind wiederum in charakteristischer Weise von der Wachstumsphase abhängig.
Im Gegensatz zu C.vinosum liegen die Aktivitätsmaxima von ADP - Sulfurylase und Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase bei C.gracile jedoch zeitlich deutlich getrennt voneinander vor.
Während die ADP - Sulfurylase ihr Maximum etwa in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase zeigt, ist die Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase erst gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase in nennenswerten Aktivitäten nachweisbar.
Zudem ist das Enzym zu keinem Zeitpunkt so aktiv wie die ADP - Sulfurylase.

2.5 Auswertung der Wachstumsexperimente bei C.purpuratum und C.minutissimum

In C.purpuratum konnte bei Anwendung der Standartmethoden weder eine APS - Reduktase noch eine ADP - Sulfurylase nachgewiesen werden.
Hier erfolgte die Umsetzung des während der Oxidation der Schwefelquelle gebildeten Sulfits ausschließlich über die AMP-unabhängige Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase.
Somit ähnelt C.purpuratum den Thiobacilli, bei denen nur T.denitrificans (Bowen et al., 1966) und T.thioparus (Peck, 1960) über eine APS - Reduktase verfügen, wohingegen alle anderen bisher untersuchten Arten wegen des Fehlens einer APS - Reduktase zu keiner Substratphosphorylierung im Zuge der Sulfitoxidation befähigt sind (Charles und Suzuki, 1966; Charles, 1969; Drozd, 1977; Adair, 1966; Moriarty und Nicholas, 1970).

C.minutissimum verfügt neben einer fest an die Membran gebundenen APS - Reduktase und einer löslichen ADP - Sulfurylase ebenfalls über eine Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase.
Dabei sind die Aktivitäten der genannten Enzyme während einer photolithoautotrophen Anzucht abhängig von der Wachstumsphase des Organismus.
Wird C.minutissimum über mehrere Passagen auf einer energiereichen C-Verbindung wie Malat oder Acetat angezogen, können während des

gesamten Wachstums weder APS - Reduktase noch ADP - Sulfurylase nachgewiesen werden.
Bei gleichzeitiger Anwesenheit einer energierreichen Kohlenstoffquelle und einer anorganischen Schwefelverbindung wie Sulfid oder Thiosulfat liegen die Aktivitäten von APS - Reduktase und ADP-Sulfurylase merklich unter denen, die sonst bei rein autotropher Anzucht zu erwarten sind.
Auch bei mixotropher Anzucht konnte eine von der jeweiligen Wachstumsphase abhängige Korrelation zur spezifischen Aktivität für die getesteten Enzyme beobachtet werden.

2.6 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse aus den Wachstumsexperimenten

Mit Ausnahme von C.purpuratum verfügen alle untersuchten Organismen über eine ADP - Sulfurylase.
Da in C.purpuratum zu keinem Zeitpunkt der beschriebenen Wachstumsexperimente das Auftreten einer APS - Reduktase oder das Vorkommen eines APS verwertenden Folgeenzyms mit den entsprechenden Aktivitäten beobachtet wurde, muß davon ausgegangen werden, daß dieser Organismus nicht zu einem zusätzlichen Energiegewinn durch Substratphosphorylierung befähigt ist.

Anders verhält es sich bei C.gracile, das unter autotrophen Anzuchtsbedingungen über eine stark wachstumsabhängige ADP - Sulfurylase verfügt.
Das Vorhandensein eines solchen Enzyms setzt notwendigerweise die Anwesenheit eines APS-erzeugenden Enzyms voraus.
Da sich auch in der unterschiedlichen Ausprägung der spezifischen Aktivität im Verlauf des Wachstums Parallelen zu den anderen ADP - Sulfurylasen herstellen lassen, könnten methodische Unzulänglichkeiten dafür verantwortlich sein, daß eine APS - Reduktase in C. gracile nicht nachgewiesen werden kann.

Für den enzymatischen Nachweis einer APS - Reduktase wurde der unphysiologische Elektronenakzeptor Kaliumhexacyanoferrat eingesetzt. Möglicherweise würde das Enzym bei Verwendung des nativen Elektronenakzeptors in vitro nachweisbar sein.
Als natürliche Akzeptoren der APS - Reduktase werden spätestens

seit dem erfolgreichen Einsatz von Cytochrom c aus Candida crusei als Akzeptor im APS - Reduktasetest (Trüper und Rogers, 1971) Cytochrome diskutiert.
Da zudem die Frage nach dem natürlichen Elektronenakzeptor der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase für die Chromatiaceae noch nicht geklärt ist, wurde beschlossen, die Cytochrome aus C.gracile anzureichern, sie zu charakterisieren und im Hinblick auf ihre mögliche Beteiligung an der Sulfitoxidation zu untersuchen.

In den folgenden Untersuchungen sollte der Frage nachgegangen werden, in wieweit die ATP - Sulfurylase in T.denitrificans und C.warmingii an der Energiegewinnung durch Substratphosphorylierung im Zuge der Sulfitoxidation beteiligt ist.

Zur Klärung der Fragestellung wurden die Sulfurylasen voneinander getrennt und angereichert, um ihre kinetische Potenz im Hinblick auf eine Beteiligung am APS - Umsatz untersuchen zu können.

3 Isolierung von Cytochromen aus Chromatium gracile

3.1 Präparative Vorbereitungen zur Isolierung der Cytochrome

400g einer tiefgefroren gelagerten Zellpaste wurden aufgetaut, mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0) versetzt und homogenisiert. Das Homogenisat wurde mittels Ultraschall im Bronson Sonifier model 75 bei einer Intensitätsstufe von 9 und einer herrschenden Stromstärke von 7 mA aufgeschlossen.
Grobe Zellpartikel und nicht aufgeschlossene ganze Zellen wurden durch eine zwanzigminütige Zentrifugation (10 000 UpM) in der Sorvall RC 2B abgetrennt. Während das Sediment verworfen wurde, wurde der Überstand zur Abtrennung noch vorhandener partikulärer Bestandteile 4h bei 144 000 x g ultrazentrifugiert.
Neben dem die Chromatophoren enthaltenen dunkelroten festen Sediment wurden durch die Zentrifugation 2 farblich gut voneinander unterscheidbare Überstände erhalten.
Während der untere noch mit Chromatophoren durchsetzt war und eine

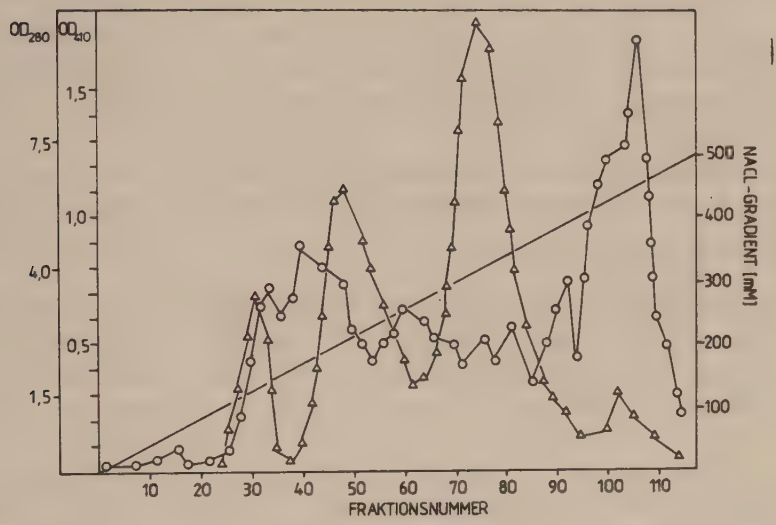
hellrote Farbe aufwies, war der gelblich eingefärbte Überstand zell- und chromatophorenfrei.
Er enthielt lösliche Proteine mit den darin vorkommenden Cytochromen.
Der chromatophorenfreie Überstand wurde vereinigt und zur Vorbereitung auf die sich anschließende Ionenaustauschchromatographie entsalzt.
Zur Abtrennung der Salze wurde eine mit aqua demin vorbehandelte G 25 (98 x 2.5 cm) verwendet. Die Abtrennung der Salze von der Proteinfraktion wurde mit einem Leitfähigkeitsmesser überwacht.

Das entsalzte Eluat wurde mit 0.1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7.8 eingestellt und anschließend auf einen Anionenaustauscher (Whatman DE 52; Säulenmaße 3.5 x 10.5 cm) aufgetragen.
Das Säulenmaterial war zuvor mit einem 2 mM Tris-HCl Puffer äquilibriert worden und wies einen pH von 7.6 auf.

3.2 Trennung der löslichen Proteine durch Anionenaustauschchromatographie

Nach erfolgtem Auftragen der Proteinlösung wurde das Säulenmaterial mit dem zweifachen Volumen des Elutionspuffers nachgewaschen, um nichtbindendes Protein von der Säulenmatrix zu entfernen.
Das Eluat wurde dabei in 5 ml Fraktionen gesammelt.
Ebenso wurde bei der stufenweise erfolgenden Erhöhung der Pufferkonzentration verfahren.
Das Gel wurde dabei nacheinander mit dem doppelten Säulenvolumen eines 2, 5, 7, 10, 15 und 20 mM Tris-HCl Puffers gleichen pH-Wertes gewaschen
Wie die spektrale Auswertung dieses stufenweise gefahrenen Gradienten ergab, wurden unter den geschilderten Bedingungen keine Cytochrome von der Matrix abgetrennt.
Zur Entwicklung des Anionenaustauschers wurde ein kontinuierlicher NaCl - Gradient (20 - 500 mM NaCl in 20 mM Tris - HCl, pH 7.6; Gesamtvoumen 460 ml) an die Säule angeschlossen und Fraktionen von 3.2 ml Umfang gesammelt.
Die Protein- und Cytochromverteilung innerhalb des Eluates wurde im Zeiss PM 4 bei einer Wellenlänge von 280 und 410 nm gegen den Elutionspuffer gemessen.

Abbildung 6: Chromatographische Trennung der löslichen Cytochrome aus C.gracile mittels Ionenaustauschchromatographie an einer Whatman DE 52 - Säule



Legende: △—△ Absorption bei 410 nm
○—○ Absorption bei 280 nm

Während des Gradientenlaufes war die zeitlich voneinander getrennte Loslösung von rotgefärbten Banden vom oberen Teil der Säule beobachtet worden. Die Darstellung des Elutionsdiagrammes in Abbildung 6 zeigt das Vorkommen von drei räumlich gut voneinander getrennten Cytochromfraktionen.
Von den entsprechenden Fraktionen wurden Spektren aufgenommen. Wie deren Auswertung ergab, handelte es sich offensichtlich um drei verschieden Cytochrome :

Maximum I enthielt ein Cytochrom c_{553}, welches in vollkommen reduziertem Zustand von der Säule eluiert wurde.

Maximum II enthielt ein Flavocytochrom und

Maximum III enthielt ein Cytochrom vom c'-Typ.

Die Fraktionen mit identischem Cytochromgehalt wurden vereinigt und getrennt voneinander weiterverarbeitet.

3.3 Anreicherung, Identifizierung und Charakterisierung von Cytochrom c_{553}

Das Cytochrom wurde im vollkommen reduzierten Zustand von dem Anionenaustauscher bei einer Salzkonzentration zwischen 105 - 150 mM NaCl eluiert.
Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Fraktionen 23 - 33 vereinigt und durch die Passage über eine G 25 - Säule (s.III, 2.1) entsalzt.

3.3.1 Ammoniumsulfatfällung

Das entsalzte Cytochrom wurde einer fraktionierten $(NH_4)_2SO_4$-Fällung unterzogen. Das erhaltene Präzipitat wurde jeweils in einer geringen Menge Puffer (Tris - HCl, 2 mM, pH 7.6) resuspendiert und in einem Acta VII auf seinen Cytochromgehalt hin überprüft.
Die Ergebnisse des Anreicherungsschrittes sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Wie aus ihr hervorgeht, sedimentierte der überwiegende Teil des Cytochroms in einem Sättigungsbereich zwischen 61 - 100%.
Die beiden Fällungsschritte wurden vereinigt und zur weiteren Reinigung auf Sephadex G 75 aufgetragen.

3.3.2 Gelfiltration an einer Sephadex G 75 - Säule

Die Filtrationssäule hatte eine Länge von 63.5 cm bei einem Durchmesser von 1 cm. Das Säulenmaterial war in 2 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.6) äquilibriert und auf denselben pH eingestellt worden. Das Sammelvolumen betrug 100 Tropfen/Fraktion (= 3.2 ml).

Nach Entwicklung der Säule wurde das Cytochrom in drei aufeinanderfolgenden Fraktionen nachgewiesen, die sich durch sehr ähnliche purity indices auszeichneten (0.331, 0.251, 0.289).
Auch nach der Gelfiltration lag das Cytochrom in der reduzierten Form vor.

Tabelle 2: Anreicherung von Cytochrom c_{553} durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Sättigungsgrad	Menge (ml)	Gesamtprotein (mg)	PI 280/417 nm_{ox}
- 20% ASF	-	-	-
- 40% ASF	1.4	5	-
- 60% ASF	1.2	9.3	7.3
- 80% ASF	1.4	8.1	0.534
-100% ASF	47.5	30.17	-

3.3.3 Elektrophoretische Reinheitskontrolle

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades des Cytochrom c_{553} wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.
Dazu wurden jeweils 50 µl des nach der Gelfiltration gewonnenen Cytochroms (PI = 0.289) auf das Gelröhrchen aufgetragen.
Nach erfolgter Entwicklung und Anfärbung mit Comassie Blau zeigte sich nur eine breite Proteinbande mit einem R_f-Wert von 0.494 .

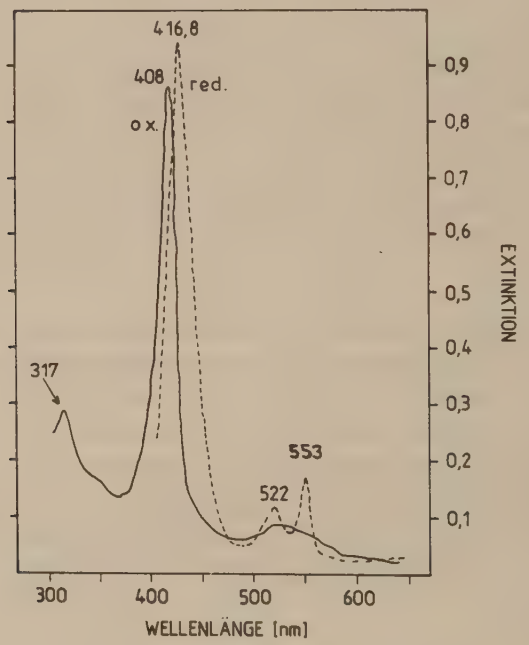
3.3.4 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sephadex G 75 und Sephacryl S 200

Mit dem letzten Anreicherungsschritt wurde zugleich das Molekulargewicht von Cytochrom c_{553} bestimmt.
Aus der aufgenommenen Eichgerade wurde ein Molekulargewicht von 28 000 ermittelt. Das entsprechende Experiment an Sephacryl S 200 führte zu einem Molekulargewicht von 30 000.

3.3.5 Aufnahme des Absorptionsspektrums

Cytochrom c_{553} wurde während aller Anreicherungsschritte im reduzierten Zustand vorgefunden.
Durch Zugabe einiger Körnchen $K_3Fe(CN)_6$ ließ es sich jedoch leicht in den oxidierten Zustand versetzen.
Wie aus Abbildung 7 ersichtlich ist, wurde der α-peak bei 553nm, der β-peak bei 522 und die Soretbande bei 417 nm gemessen.
Ein weiteres charakteristisches Maximum trat bei 317 nm auf.
Nach Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat lag der γ-peak bei 408 nm.

Abbildung 7: Spektrum des gereinigten Cytochrom c_{553} aus C.gracile



3.3.6 Aufnahme eines alkalischen Pyridinspektrums

Um eine Identifizierung von Cytochrom c_{553} als c-Typ Cytochrom durchführen zu können, wurde das Cytochrom mit einer eiskalten Säure-Acetonmischung versetzt.
Auch durch diese Behandlung konnte die Hämgruppe des Cytochroms nicht abgespalten werden.

3.3.7 Gehalt an Cytochrom c_{553} pro 1 000 g Zellnaßgewicht

Im letzten Reinigungsschritt wurde für das Cytochrompräparat ein Gesamtproteingehalt von 4.53 mg ermittelt.
Setzt man die Homogenität des Cytochroms voraus (s. 2.3.3), kann davon ausgegangen werden, daß pro 1 000 g Zellmaterial (Naßgewicht) 0.3775 µmol Cytochrom c_{553} enthalten sind.

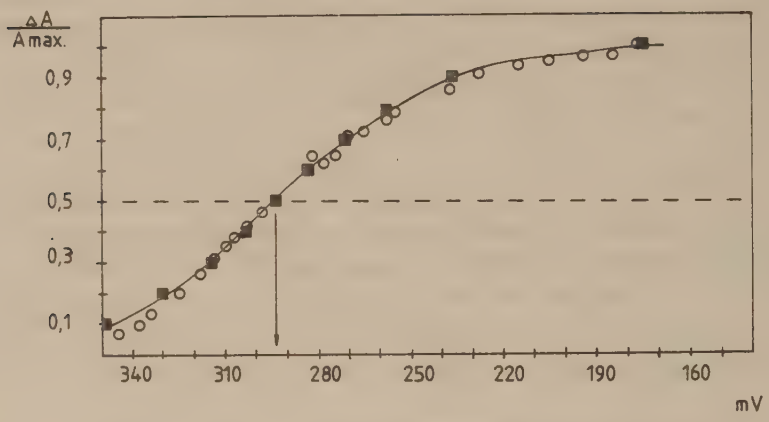
3.3.8 Bestimmung des Redoxpotentials

180 µg des gereinigten Cytochrom c_{553} wurden in 1.8 ml einer Pufferlösung folgender Zusammensetzung gegeben:

40 mM 3(N-morpholin) propansulfonat
0.15 M Mannit
50 mM Saccharose
10 mM EDTA
10 mM Oxalsäure

Die verwendete Pufferlösung hatte einen pH von 7.0 . Aufnahme und Auswertung der Messung erfolgten wie unter (II,5.6) im Methodenteil beschrieben.
Für Cytochrom c_{553} konnte ein Redoxpotential von 293 mV ermittelt werden. Die über die Titration mit Kaliumhexacyanoferrat erhaltenen Werte waren identisch mit den theoretisch zu erwartenden, die sich aus der Nernst'schen Gleichung bei Berücksichtigung des ermittelten Mittelpunktpotentials für n = 1 ergaben.
Die erzielten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß jeweils nur ein Elektron auf den Hämanteil des Cytochroms übertragen wird und das Cytochrom nur eine Hämgruppe pro Proteinmolekül besitzt.

Abbildung 8: Ferricyanidtitrationskurve für Cytochrom c_{553}



Es wurde die Absorptionsveränderung des Cytochroms in seinem α - Maximum ermittelt und den Berechnungen zugrunde gelegt.

Legende: —○—○— Ferricyanidtitrationskurve

—■—■— theoretisch zu erwartende Werte für n = 1, errechnet aus der Nernst'schen Gleichung

3.4.1 Anreicherung, Identifizierung und Charakterisierung des Flavocytochroms aus Chromatium gracile

Das Flavocytochrom konnte in einem ersten Anreicherungsschritt durch Ionenaustauschchromatographie (2.2) von 2 weiteren Cytochromen abgetrennt werden.

Zur weiteren Anreicherung wurden die Fraktionen 61 - 84 vereinigt, durch Gelfiltration an einer Sephadex G 25 - Säule entsalzt (2.1) und einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterworfen.

Die ausgefällten Proteine wurden in einer geringen Menge 2 mM Phosphatpuffers vom pH 7.6 resuspendiert und spektralphotometrisch auf ihren Cytochromanteil untersucht.

Das Flavocytochrom fiel in einem Sättigungsbereich zwischen 65 - 100%. Die das Flavocytochrom enthaltenen Fällungsschritte wurden vereinigt und mittels einer Amiconkammer (Filter PM 10, Druck 0.8 at, Treibgas N_2) auf ein Volumen von 2.5 ml eingeengt.

Eine weitere Abtrennung von Fremdproteinen sollte durch eine Gelfiltration an einer Sephadex G 75 - Säule (90 x 1.1 cm, äquilibriert in 2 mM Phosphatpuffer vom pH 7.6) erreicht werden.
Da der erzielte Reinheitsgrad (PI = 1.2) nicht als ausreichend erachtet wurde, schloß sich eine erneute Ionenaustauschchromatographie an (Whatman DE 52, Säulenmaße 1.5 x 12 cm, äquilibriert in 2 mM Phosphatpuffer, pH 7.6).
Zur Abtrennung der verbleibenden Fremdproteine erfolgte zunächst eine schrittweise Heraufsetzung der Puffermolarität bis zu einem Wert von 20 mM.
Die eigentliche Elution des Flavoproteins erfolgte durch Anlegen eines kontinuierlichen NaCl - Gradienten (20 - 300 mM NaCl in 20 mM Phosphatpuffer, pH 8.0; 200 ml Gesamtvolumen).
Wie die spektrale Auswertung der Fraktionen ergab, wurde das Flavocytochrom in einem Bereich zwischen 180 - 240 mM NaCl von der Säulenmatrix abgetrennt. Für die Spitzenfraktion konnte ein Purity Index von 0.403 ermittelt werden.

3.4.2 Elektrophoretische Reinheitskontrolle

Ein erster Hinweis auf die Homogenität des gewonnenen Cytochrompräparates wurde aus dem Vergleich der Purity Indices der Flavoproteine gezogen, die aus anderen phototrophen Bakterien isoliert und für elektrophoretisch rein befunden wurden (Bartsch et al., 1968; Meyer et al., 1968; Steinmetz und Fischer, 1981).
Die aus C.vinosum, Chlorobium limicola f. thiosulfatophilum und Chlorobium limicola Stamm 6330 isolierten Flavocytochrome wiesen höhere Purity Indices auf als das aus C.gracile angereicherte Protein.
Nach Durchführen der Disk-Gelelektrophorese konnte nach Anfärben des Gels mit Comassie Blau lediglich eine Bande entdeckt werden, die ein einen R_f-Wert von 0.414 aufwies.

3.4.3 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sephadex G 75 und Sephacryl S 200

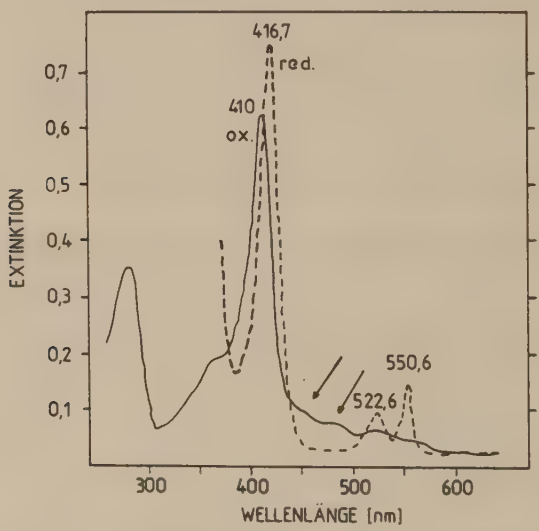
Die über die Gelfiltration ermittelten Molekulargewichtswerte unterschieden sich geringfüg voneinander.
Nach der Gelfiltration an der Sephacryl S 200 - Säule wurde ein Molekulargewicht von 72 000 ermittelt, die kalibrierte Sephadex

G 75 - Säule wies das Molekulargewicht mit 68 000 aus.

3.4.4 Aufnahme des Absorptionsspektrums

Im oxidierten Zustand weist das Flavoprotein bei 440 und 480 nm zwei deutlich sichtbare Schultern auf, die charakteristisch für die Flavinkomponente des Cytochroms sind (Bartsch, 1968).
Die Soretbande zeigt ihr Maximum bei 410 nm.
Das Flavocytochrom konnte durch Zugabe eines Körnchens Dithionit in den reduzierten Zustand versetzt werden. Die Soretbande verschob sich daraufhin von 410 auf 416.7 nm.
Die sichtbar gewordenen α- und β-Banden wiesen Extinktionsmaxima bei 522.6 resp. 550.6 nm auf.
Die im oxidierten Zustand sichtbaren Schultern wurden durch Zugabe des Reduktanten in einer für Flavocytochrome typischen Weise ausgeblichen.

Abbildung 9: Absorptionsspektrum des Flavocytochroms



Die Pfeile weisen auf die im oxidierten Zustand sichtbaren Schultern hin.

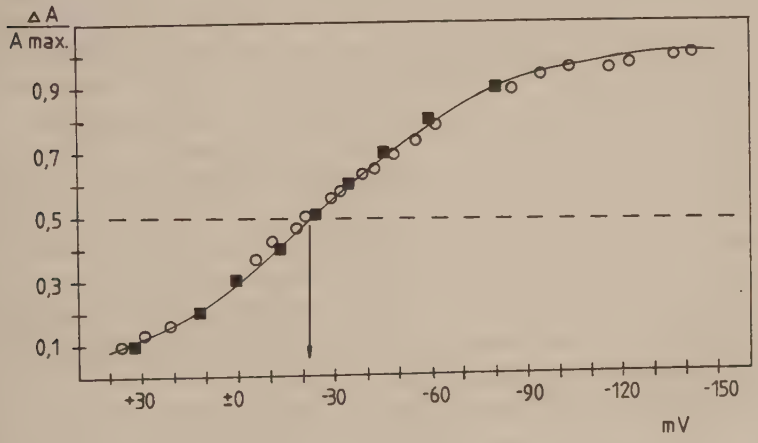
3.4.5 Flavocytochromgehalt pro 1 000 g Zellen (Naßgewicht)

Da für das Flavocytochrom ein Molekulargewicht von 68 000 ermittelt worden war, das erhaltene Präparat als isoelektrisch rein angesehen werden muß und die Gesamtproteinkonzentration nach dem letzten Anreicherungsschritt 308 mg betrug, befinden sich ca. 77 µmol Flavoprotein in 1 000 g Zellmaterial (Naßgewicht).

3.4.6 Bestimmung des Redoxpotentials

Zur Bestimmung des Redoxpotentials wurden 5 nmol Flavocytochrom in 1.8 ml des unter (2.3.8) aufgeführten Puffers suspendiert. Die verwendeten Mediatoren entsprachen denen unter (II, 5.6) im Methodenteil genannten Substanzen.
Für das Mittelpunktpotential konnte ein Wert von -21.6 mV ermittelt werden. Das Ergebnis der Redoxtitration ist in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

Abbildung 10: Ferricyanidtitrationskurve des Flavocytochroms aus Chromatium gracile



Legende: Ferricyanidtitrationskurve
theoretisch zu erwartende Werte

Die Anzahl der beim Redoxvorgang titrierten Elektronen wurden durch Vergleich mit den theoretisch zu erwartenden Werten für n = 1 und n = 2 ermittelt, die sich aus der Nernst'schen Gleichung bei einem Redoxpotential von -21.6 mV errechnen ließen.
Die Werte der durch Titration erhaltenen Kurve waren weitgehend deckungsgleich mit den errechneten Werten für n = 1.
Demzufolge wird nur 1 Elektron auf den Hämanteil des Cytochroms übertragen. Das Flavoprotein besitzt nur eine Hämgruppe pro Proteinmolekül.

3.5.1 Anreicherung, Identifizierung und Charakterisierung des Cytochrom c' aus Chromatium gracile

In einem ersten Anreicherungsschritt war Cytochrom c' durch die Passage des 144 000 x g Überstandes an einem Ionenaustauscher von 2 anderen löslichen Cytochromen abgetrennt worden.
Dabei wurde Cytochrom c' bei einer Salzkonzentration zwischen 170 und 270 mM NaCl von der Matrix abgelöst.
Die Fraktionen mit Cytochrom c' - Gehalt (116 ml, entsprechend einem Gesamtproteingehalt von 1119 mg) wurden vereinigt und durch Ultrafiltration in einer Diaflokammer (Filter PM 10, Druck 0.8 at, N_2 als Druckgas) auf ein Gesamtvolumen von 20 ml eingeengt.
Das Filtrat wurde zum Entsalzen über eine Sephadex G 25 - Säule geschickt, bevor es einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterworfen wurde.
Das ausgesalzene Protein wurde jeweils in einer geringen Menge eines 20 mM Phosphatpuffers (pH 7.6) resuspendiert.
Spektrale Untersuchungen der einzelnen Fällungsschritte zeigten, daß die Hauptmenge des Cytochrom c' bei einer Sättigugnskonzentration zwischen 85 und 100% ausfiel.
Der das Cytochrom enthaltene letzte Fällungsschritt enthielt eine Proteinmenge von 408 mg und wies einen Reinheitsgrad von 1.43 auf.

Durch Gelfiltration an einer Sephacryl S 200 - Säule wurde eine weitere Anreicherung erzielt. Cytochrom c' konnte in nennenswerten Konzentrationen in 3 Fraktionen festgestellt werden.

Der Gesamtproteingehalt aller Cytochrom c' enthaltenen Fraktionen betrug 4.14 mg. Es ergab sich ein durchschnittlicher Purity Index

von 0.583.

3.5.2 Elektrophoretische Reinheitskontrolle

Nach Durchführung der Disk - Gelelektrophorese und anschließender Proteinanfärbung mit Comassie - Blau wurde eine breite Bande (R_f-Wert = 0.946) und eine schmalere sichtbar.
Schon vor der Anfärbung konnte nach Beendigung der Disk - Gelelektrophorese Cytochrom c' aufgrund seiner Eigenfärbung erkannt werden. Das Cytochrom lief als rötlich gefärbte Bande kurz hinter dem als Marker aufgetragenen Bromphenolblau.
Die darunter liegende Bande, die erst durch Anfärbung sichtbar wurde, stellt offensichtlich eine Kontamination durch Fremdproteine dar. Versuche zur weitergehenden Reinigung des Cytochroms scheiterten jedoch.

3.5.3 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

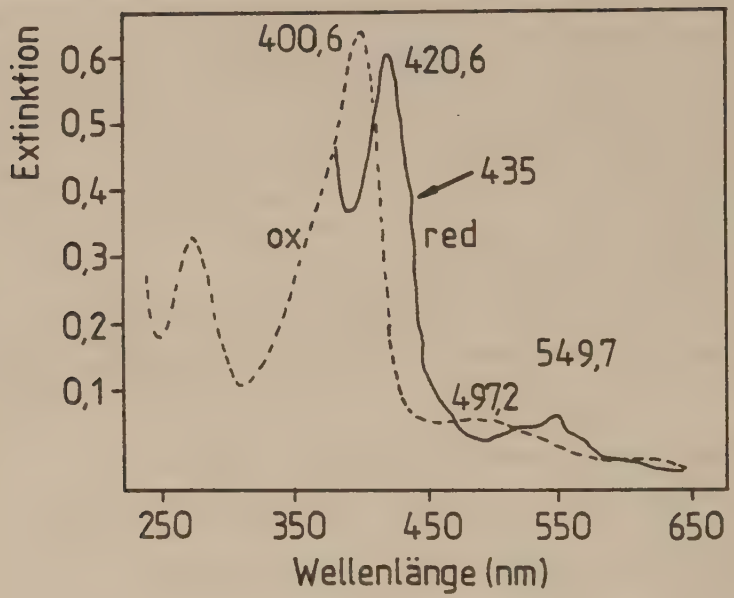
Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex G 75.
Dabei wurde ein Molekulargewicht von 12 500 ermittelt.

3.5.4 Aufnahme des Absorptionsspektrums

Von dem gereinigten Cytochrom c' (Purity Index 0.583) wurde ein Spektrum im Bereich zwischen 650 und 250 nm aufgenommen.
Das im oxidierten Zustand isolierte Cytochrom zeigte bei 400.6 nm eine breite Absorptionsbande, die charakteristisch für high spin Cytochrome ist und ein weiteres Maximum bei 497.2 nm.
Nach Zugabe von 2 Kristallen Dithionit wurde das Cytochrom in den reduzierten Zustand versetzt. Die Bande lag nun in charakteristischer Weise gespalten vor. Sie wies ihr Maximum bei 420.6 nm auf und hatte bei 435 nm eine deutliche Schulter.
Während der peak bei einem pH von 7.6 nicht zu erkennen war, wurde bei 549.7 nm eine charakteristische Bande ausgebildet.
Etwas ungewöhnlich ist die Beobachtung, daß die Bande im reduzierten Zustand noch nicht einmal die gleiche Höhe einnimmt wie im oxidierten.
Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß das Cytochrom bereits

partiell denaturiert vorlag.

Abbildung 11: Spektrum des gereinigten Cytochrom c' aus C.gracile



3.5.5 Bestimmumg des Redoxpotentials

Der Grad der schrittweisen Reduktion sollte aus der Oxidationsänderung bei 497.2 nm ermittelt werden.
Es traten jedoch nicht überbrückbare Schwierigkeiten bei der Einstellung der Reaktionsgleichgewichte nach Zugabe des Titriermittels auf. Da zudem nur geringe Absorptionsänderungen im zugrundelie genden Meßbereich auftraten, kann das Redoxpotential von Cytochrom c' lediglich abgeschätzt werden.
Eine eindeutige Titrationskurve konnte trotz zahlreicher Abänderung in der Mediatorenzusammensetzung nicht erzielt werden.
Das Mittelpunktpotential dürfte bei einem pH von 7.0 einen Wert um den Neutralpunkt annehmen.
Für die c' - Cytochrome anderer Chromatiaceae (C.vinosum, Bartsch

et al., 1968; Thiocapsa pfennigii, Meyer et al., 1973; C.warmingii, Wermter, 1983) wurden ähnliche Mittelpunktspotentiale ermittelt.

3.5.6 Cytochrom c' - Gehalt pro 1 000 g Zellmaterial (Naßgewicht)

Da Cytochrom c' nicht bis zur Homogenität gereinigt werden konnte, läßt sich der Gehalt des Cytochroms an 1 000 g Zellmaterial nur grob abschätzen.
Würde es sich um ein homogenes Präparat handeln, betrüge sein Anteil an 400 g Zellmaterial 4.14 mg.
Legt man das ermittelte Molekulargewicht von 12 500 für die Berechnung zugrunde, so ergibt sich ein Cytochrom c' - Gehalt von 0.653 µmol pro 1 000 g Zellmasse (Naßgewicht).

4 Die APS - Reduktasen

Die in den untersuchten Organismen nachgewiesenen APS - Reduktasen zeichnen sich durch eine äußerst feste Bindung an die Chromatophoren aus.
So konnte in C.minutissimum und C.warmingii die Aktivität des Enzyms lediglich in den Chromatophorenfraktionen nachgewiesen werden.
Eine Ausnahme bildete C.vinosum, bei dem sich nach erfolgter Ultrazentrifugation knapp 10% der vorhandenen Gesamtaktivität im löslichen Überstand befanden.

Um die Enzyme hinsichtlich ihrer physiologischen und strukturellen Eigenschaften eingehender untersuchen zu können, wurde eine Solubilisierung der membrangebundenen APS - Reduktasen angestrebt.

4.1 Versuche zur Solubilisierung der chromatophorengebundenen APS - Reduktasen

Die Aufschlußmethoden wurden variiert. Statt des sonst üblichen Aufschlusses im Ultraschalldesintegrator wurde das Zellmaterial in einer French Press aufgebrochen. Dabei wurden in Parallelversuchen

sowohl die Anzahl der Durchgänge als auch der aufgewendete Druck verändert.

Die Solubilisierung des Enzyms wurde jedoch ebensowenig erreicht wie in vorangegangenen Experimenten, in denen die optimale Verweildauer der Zellsuspensionen im Ultraschalldesintegrator ermittelt werden sollte.
Da eine irreversible Schädigung der APS-Reduktase während des Lösungsvorganges als Folge der gewählten rauhen Aufschlußbedingungen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde auf schonendere Verfahren zurückgegriffen.
Zwar konnten die Zellen über einen osmotischen Schock und durch Lysozymbehandlung aufgeschlossen werden, jedoch wurde auch unter diesen Bedingungen keine APS - Reduktaseaktivität im chromatophorenfreien Proteinüberstand nachgewiesen.

Durch Hitzebehandlung konnte zwar eine Abtrennung von Proteinen aus der Chromatophorenfraktion beobachtet werden, aber die APS - Reduktase wurde nicht in aktiver Form aus dem Überstand isoliert.

Auch die Zugabe von Mercaptoethanol und DTE (SH - Gruppen schützende Agenzien) zum Inkubationsansatz in unterschiedlichen Konzentrationen führte zu keinem positiven Ergebnis.

Das gleiche negative Resultat wurde erhalten, wenn Chromatophorenfraktionen mehrmals bei -18^{o}C eingefroren und wiederaufgetaut wurden. Wie schon bei der Hitzebehandlung gingen aufgrund der wechselnden Temperaturbedingungen Proteine in die lösliche Phase über, eine aktive, lösliche APS - Reduktase wurde auf diesem Wege jedoch nicht erhalten.

4.1.2 Chemische Methoden

4.1.2.1 Beeinflussung durch Ionen

Durch Zusatz des Chelatbildners EDTA in unterschiedlich hohen Konzentrationen zum resuspendierten Sediment der Ultrazentrifuge sollte eine Abtrennung des chromatophorengebundenen Enzyms durch Chelatisierung der zwischen Membran und Enzym wirkenden Bindungsionen herbeigeführt werden.
Die Einsatzkonzentration des EDTA wurde zwischen 0.1 und 1 M variiert.

Ein Herauslösen des Enzyms aus dem Membranverband konnte nicht herbeigeführt werden.

Der von Penefsky und Tzagoloff vorgeschlagene Weg der Extraktion (1971) von wasserlöslichen Proteinen aus der Membran durch Dialyse gegen Lösungen mit geringer Ionenstärke war ebensowenig von Erfolg gekrönt wie die Methode des Aussalzens durch extrem hohe Salzkonzentrationen.

4.1.2.2 Die Beeinflussung durch Solventien und Detergenzien

Über eine Fällung mit organischen Lösungsmitteln (Aceton, iso-Buthanol, Methanol, Ethanol/Methanolgemisch) wurde versucht, das Enzym dem Membranverband zu entziehen.
Da die meisten Enzyme bei Zimmertemperaturen durch organische Lösungsmittel inaktiviert werden, wurden die eigentlichen Fällungen bei Temperaturen um den Gefrierpunkt durchgeführt, nachdem zuvor die eingesetzten Lösungsmittel auf $-18^{o}C$ vorgekühlt worden waren.

Die Konzentration der Solventien betrug nie mehr als 0.3 mol/l.
Die Fällungen führten zu einer biphasischen Auftrennung in eine wässrige Phase und eine Lösungsmittelphase.
Beide Phasen wurden durch eine zwölfstündige Dialyse von den Detergenzien befreit und anschließend enzymatisch auf ihren Gehalt an APS - Reduktase untersucht.
Die Verwendung von Solventien führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis.

In diversen Testreihen wurde die Solubilisierung der APS - Reduktasen durch den Einsatz der Detergenzien Triton X 100, Deoxycholat, TWEEN 80 und SDS versucht.
Dabei wurden sowohl Konzentration, Einwirkdauer und die Reaktionstemperatur einer ständigen Variation unterworfen.
Es wurde zwar eine von den jeweiligen Bedingungen abhängige Solubilisierung von Proteinen unter Einwirkung der diversen Detergenzien beobachtet, aber auch diese Testreihe führte nicht zu einer (partiellen) Solubilisierung der APS - Reduktase.

Da eine genauere Charakterisierung der APS - Reduktase nur im löslichen Zustand erfogen konnte, wurde die APS - Reduktase aus C.

vinosum zu diesem Zwecke ausgewählt.
Das Enzym unterschied sich von den anderen beiden APS - Reduktasen dadurch, daß sich geringe spezifische Aktivitäten auch in der löslichen Proteinfraktion nachweisen ließen.

4.2 Anreicherung der APS - Reduktase aus C.vinosum

Um die APS - Reduktase mit ausreichenden Aktivitäten isolieren zu können, wurden ca. 500 g Zellmaterial von C.vinosum aufgeschlossen.

Die Anzucht der Zellkulturen erfolgte mit Thiosulfat.
Um jedoch eine hohe Zellausbeute zu erreichen, wurden die Zellkulturen kurz vor ihrem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (der gebildete Elementarschwefel war fast vollständig aufoxidiert) mit einer 0.05 prozentigen Sulfidlösung nachgefüttert.
Sechs Stunden nach dem letzten Füttern wurde die Zellsuspension in einer Durchlaufzentrifuge abgeerntet. Die erhaltene Zellpaste wurde tiefgefroren gelagert.
Nachdem eine genügend große Menge zur Verfügung stand, wurde die Zellpaste aufgetaut, in 100 mM Tris - HCl Puffer vom pH 8.0 resuspendiert und nach erfolgter Homogenisation durch eine zweimalige Passage in einer French Press bei einem herrschenden Druck von 8.8×10^7 Pa aufgeschlossen.
Die weitere Herstellung des zellfreien Überstandes, der für die Enzymanreicherung herangezogen wurde, erfolgte nach der unter II,3.1 beschriebenen Methode.

Der zellfreie Überstand diente als Ausgangsmaterial für die Anreicherung der APS - Reduktase.
Alle folgenden Aktivitätsbestimmungen wurden bei konstanter Temperatur (25^oC) und einem pH von 8.0 im Zeiss Spektralphotometer PM 4 bei angeschlossenem Schreiber durchgeführt.

Im 2.Anreicherungsschritt wurde dem eisgekühlten Extrakt unter ständigem Rühren fein gemahlenes $(NH_4)_2SO_4$ zugefügt.
Die Hauptmenge der APS - Reduktase präzipitierte bei einer Ammoniumsulfatsättigung zwischen 40 - 60%. Das ausgefällte Protein wurde in einer geringen Menge eines 20 mM Tris - HCl Puffers vom pH 7.8 resuspendiert.
Da die Ammoniumionen den photometrischen Test beeinflussen, wurde

der Extrakt durch eine zweimalige Passage über eine G 25 - Säule (1,5 x 3 cm) entsalzt.
Die weitere Anreicherung der APS - Reduktase erfolgte über Ionenaustauschchromatographie an einer Whatman DE 52 - Säule (1.2 x 7 cm), die in einem 2 mM Tris - HCl Puffer äquilibriert und auf einen pH von 7.6 eingestellt worden war.
Durch schrittweise Erhöhung der Pufferkonzentration (2, 5, 7, 10 15 und 20 mM; jeweils 50 ml Gesamtvolumen) wurden weniger fest an die Matrix bindende Proteine abgetrennt. Da die APS - Reduktase durch die fraktionierte Elution nicht abgelöst werden konnte, wurde ein 150 ml umfassender Gradient (0 - 300 mM NaCl in 20 mM Tris - HCl, pH 7.6) an die Säule angeschlossen.
Es wurden Fraktionen von 1.6 ml Volumen gesammelt.

Die photometrische Auswertung ergab, daß die APS - Reduktase in einem Bereich zwischen 150 und 190 mM NaCl von der Säule eluiert wurde.
Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, unter Verwendung einer Amiconkammer (Filter PM 10, N_2 als Treibgas bei einem Druck von 0.8 at) auf ein Gesamtvolumen von 2 ml eingeengt und anschließend einer Gelfiltration an einer Sephacryl S 200 - Säule unterworfen. Die Säule hatte die Maße 1.2 x 102 cm und war in 20 mM Tris - HCl Puffer äquilibriert worden. Das Säulenmaterial hatte einen pH - Wert von 7.8 . Die Elution erfolgte unter Verwendung desselben Puffers; dabei wurden Fraktionen von je 1.6 ml Volumen gesammelt.

Eine Übersicht über die Anreicherungsschritte und ihre Effektivität vermittelt Tabelle 3.

4.3 Charakterisierung der partiell gereinigten APS - Reduktase

4.3.1 Testbedürfnisse und Substratspezifität

Um die Reaktion der APS - Reduktase von der einer Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase abgrenzen zu können, wurde die Reaktion durch Zugabe von AMP gestartet. Das im letzten Anreicherungsschritt gewonnene Präparat war frei von Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase, denn weder im Ferricyanid noch im Cytochrom c gekoppelten Test konnte eine Extinktionsveränderung ohne AMP - Zugabe registriert werden.

Tabelle 3: Anreicherung der APS - Reduktase aus C.vinosum Stamm 986

Arbeitsgang	Volumen (ml)	Gesamtprotein (ml)	Protein (mg/ml)	Aktivität (mU/ml)	Gesamtaktivität (mU)	Spez. Aktivität (mU/mg)	Anreicherungs-faktor	Ausbeute
Überstand der UZ	260	1738	6.48	46.7	12160	7	1	100
$(NH_4)_2SO_4$ Fällung	29.4	428.9	14.57	312	9200	21.4	3.05	75.7
Ionenaus-tauscher	15	119.2	7.94	51	7660	64.3	9.19	92.9
Gelfil-tration	6	2.4	4	755	4530	189	27	37.3

Als Elektronenakzeptor konnte neben Ferricyanid Cytochrom c aus Candida crusei verwendet werden, jedoch lag dann die Aktivität um fast eine halbe Zehnerpotenz unter der mit Ferricyanid erzielten.

Die aus C.gracile isolierten und angereicherten löslichen Cytochrome konnten nur bedingt als Akzeptoren der APS - Reduktase eingesetzt werden. Die bei ihrem Einsatz ermittelten Umsetzungen lagen deutlich unter denen, die mit Ferricyanid und Cytochrom c aus Candida crusei erzielt wurden.
Die Ergebnisse aus diesen Tests sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die nativen Cytochrome unter suboptimalen Bedingungen getestet wurden.
Wegen der begrenzten Menge an zur Verfügung stehendem Material konnt nur eine limitierte Anzahl von Vorversuchen durchgeführt werden.
Die Enzymaktivitäten wurden unter Standartbedingungen gemessen (Sulfitkonzentration 100 µM, AMP - Konzentration 50 µM, Testtempe-

ratur 25°C, pH des 20 mM Tris - HCl Puffers 8.0).

Mit Cytochrom c aus Pferdeherz konnten im photometrischen Testsystem keine Aktivitäten der APS - Reduktase nachgewiesen werden.

Tabelle 4: Elektronenakzeptoren der APS - Reduktase aus C.vinosum

Getesteter Elektronenakzeptor	Spezifische Aktivität (E/mg Protein
Ferricyanid	0.189
Cytochrom c aus Candida crusei	0.043
Cytochrom c_{553}	0.021
Cytochrom c'	0.02
Flavocytochrom	0.029

4.3.2 Einfluß des pH - Wertes auf die Aktivität der APS - Reduktase

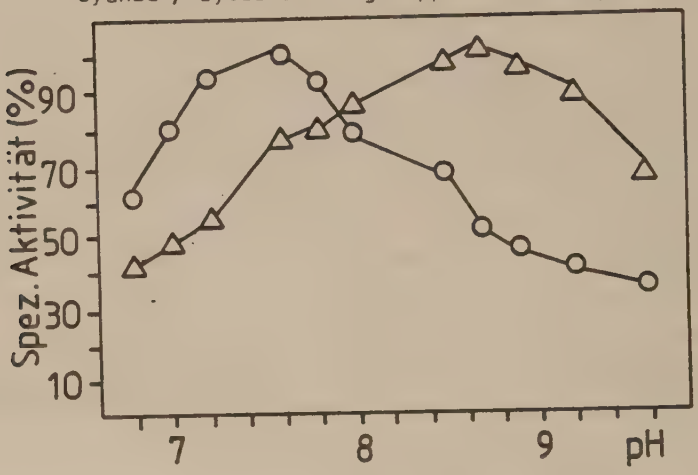
Das pH - Optimum der Reaktion wurde im spektralphotometrischen Testsystem ermittelt.
In einer Reihe von Parallelversuchen wurde der pH - Wert des Ansatzes mit 0.1 M Tris - HCl Puffer variiert.
Im Ferricyanid-gekoppelten Testsystem war das Enzym im gesamten getesteten pH - Bereich zwischen pH 6.8 und 9.6 aktiv.
Maximale Aktivitäten wurden bei einem pH von 8.2 gemessen.

Wurde Cytochrom c aus Candida crusei als Elektronenakzeptor verwendet, verlagerte sich die pH - Optimierungskurve in den neutraleren Bereich.
Bei einem pH unterhalb von 7.2 konnte eine rasche Abnahme der spezifischen Aktivität beobachtet werden. Das Optimum der Reaktion stellte sich unter diesen Bedingungen bei pH 7.6 ein.
Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 12 zusammengefaßt.

4.3.3 Temperaturoptimum der APS - Reduktase

Das Temperaturoptimum der von der APS - Reduktase katalysierten Reaktion wurde im Zeiss PM 4 bestimmt, dessen Schlitten über ein Wasserbad exakt temperiert wurde.

Abbildung 12: Einfluß des pH - Wertes auf den AMP - abhängigen Umsatz der Sulfitoxidation für C.vinosum im Ferricyanid-/ Cytochrom c gekoppelten Testsystem



Im Ferricyanid-gekoppelten Test(△—△) entsprechen einer Aktivität von 100% 0.21 Einheiten, im Cytochrom c-gekoppelten Test(○—○) 61 mE.

Der komplette Reaktionsansatz wurde mit dem Enzym für 5 min bei der Testtemperatur vorinkubiert, bevor der katalytische Umsatz durch Zugabe von AMP gestartet wurde.
Unter diesen Bedingungen erreichte das Enzym bei einer Temperatur von 42°C seine Maximalaktivität. Oberhalb dieser Temperatur trat eine rasche Inaktivierung ein.
Die Ergebnisse wurden unabhängig von der Wahl des Elektronenakzeptors ermittelt.

4.3.4 Haltbarkeit der APS - Reduktase

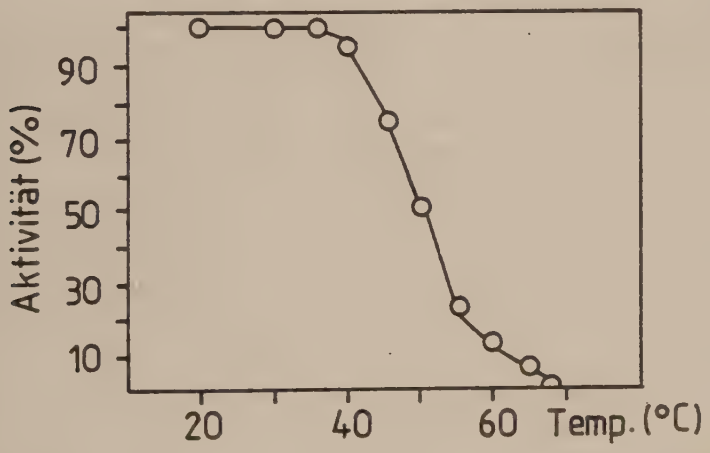
Waren die Proteinkonzentrationen in den APS - Reduktasepräparaten gering (Proteinkonzentration < 1mg/ml), kam es bei einer Lagerung auf Eis zu einer raschen Inaktivierung des Enzyms. Nach ca. 9h konnte nur noch die Hälfte der Ausgangsaktivität nachgewiesen werden.

Die spezifischen Aktivitäten der an die Chromatophoren gebundenen APS - Reduktase blieben jedoch über einen Zeitraum von mehreren Wochen bei einer Lagerungstemperatur von -18°C nahezu konstant.

Im gebundenen Zustand vertrug das Enzym selbst ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen ohne nennenswerte Aktivitätsverluste.

Mit einem ca. 17fach angereicherten Extrakt wurde die Temperatur bestimmt, bei der das Enzym 50% seiner Ausgangsaktivität verliert (T_{50}).
Dazu wurden gleiche Mengen eines Enzymextraktes (Proteinkonzentration 4.3 mg/ml) für 15 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.
Eventuell ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Bis zur Messung wurden die Extrakte im Eisbad gelagert.

Abbildung 13: Temperaturempfindlichkeit der löslichen APS - Reduktase



Als Elektronenakzeptor wurde Ferricyanid verwendet. Der Maximalaktivität von 100% entsprach einer spezifischen Aktivität von 117 mE.

Bis zu einer Temperatur von 40°C konnte kaum ein Aktivitätsverlust festgestellt werden, dann jedoch trat ein rapider Umsatzrückgang auf. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei 68°C verlor das Enzym seine katalytischen Fähigkeiten.

Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 13 zusammenfassend dargestellt.

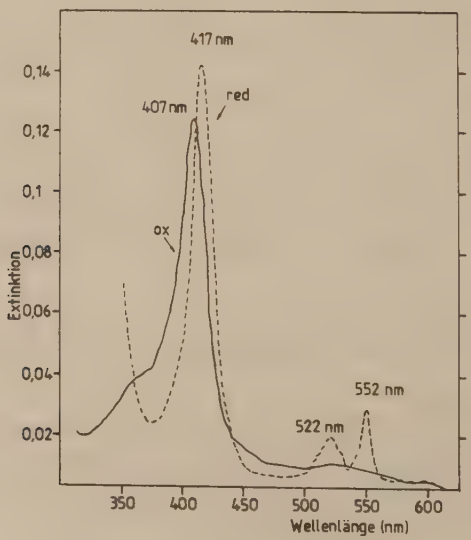
4.3.5 Molekulargewicht der APS - Reduktase

Das Molekulargewicht der APS - Reduktase wurde durch Gelfiltration an einer Sephacryl S 200-Säule ermittelt. Die Eichung der Säule wurde mit den Proteinen der Combithek II (Boehringer Mannheim) vorgenommen.
Aus dem Vergleich der Elutionsvolumina wurde für die APS - Reduktase aus C.vinosum auf ein Molekulargewicht von 185 000 geschlossen.

4.3.6 Spektrale Untersuchungen der APS - Reduktase

Die Spektralaufnahme der APS - Reduktase aus C.vinosum gibt Hinweise auf einen Cytochromanteil des Enzyms.
Ob es sich hierbei tatsächlich um einen festen Bestandteil der APS - Reduktase oder um eine Verunreinigung handelt, konnte nicht mit

Abbildung 14: Spektrum der partiell gereinigten APS - Reduktase



letzter Sicherheit geklärt werden.
Das aufgenommene Spektrum (Abbildung 14) weist eine starke Ähnlichkeit zu dem auf, welches von Trüper und Rogers (1971) für die APS - Reduktase aus Thiocapsa roseopersicina aufgezeichnet wurde.

4.3.7 Aussagen zur Reinheit des Präparates

Die Polyacrylamid - Diskgelelektrophorese sollte Auskunft über den Reinheitsgrad des angereicherten Enzympräparates liefern.
Es wurde auf das von Maurer (1971) beschriebene Gelsystem 1a zurückgegriffen.
Nach Auswertung des Experimentes konnten durch Anfärben mit Comassie Blau 7 Proteinbanden sichtbar gemacht werden.
Eine Lokalisation der APS - Reduktase im Gel aufgrund der von Skyring und Trudinger (1973) beschriebenen Färbemethode zeigte trotz Variation der Testbedingungen keinen Erfolg.

4.3.8 Nukleotidspezifität

Eine Reihe von Nukleotiden wurde auf ihre Fähigkeit hin untersucht, der APS - Reduktase als Substrat zu dienen (Tabelle 5).
Dabei wurde die höchste Aktivität sowohl im Cytochrom c als auch im Ferricyanid - gekoppelten Test mit der Purinbase AMP erzielt.
Das Ergebnis läßt darauf schließen, daß auch in vivo AMP das natürliche Substrat der APS - Reduktase ist.
Zu gleichen Ergebnissen führten die Untersuchungen von Lyric und Suzuki (1970), Trüper und Rogers (1971) und Peck et al. (1965).

Die Wahl des Elektronenakzeptors hatte auf den Umsatz der Mononukleotide nur einen leicht modifizierenden Einfluß und führte im Prinzip zu ähnlichen Ergebnissen.
Auffällig jedoch ist die Tatsache, daß bei Verwendung von Cytochrom c aus Candida crusei eine geringere Nukleotidspezifität von seiten der APS - Reduktase vorzuliegen scheint, da die Enzymaktivitäten bei allen getesteten Nukleotiden eindeutig höher lagen als im Ferricyanid - gekoppelten Testsystem.

Bei allen vorliegenden Versuchsergebnissen über APS - Reduktasen zeigt das Enzym eine höhere spezifische Aktivität mit Purin- als mit Pyrimidinderivaten.

Unterschiede bestehen bei den durchgeführten Untersuchungen lediglich im Umfang der gemessenen relativen spzifischen Aktivitäten (Bowen et al. , 1966; Peck, 1962; Lyric und Suzuki, 1970b; Kirchhoff und Trüper, 1974;Trüper und Rogers, 1971; Stille, 1982; Leyendecker, 1983).

Tabelle 5: Nukleotidspezifität der gereinigten APS - Reduktase aus C.vinosum

Nukleotid	Elektronenakzeptor $K_3Fe(CN)_6$	Cytochrom c
AMP	100	100
cAMP	9.4	-
dAMP	24.9	74
CMP	12	36
GMP	37	50
IMP	48	65
UMP	34	36
ADP	-	-
ATP	-	-

Die Messungen wurden unter idenitischen Bedingungen bei 25°C durchgeführt. Die eingesetzte Nukleotidmenge lag in allen Fällen bei 1 mM. Dabei geben die Zahlenwerte die maximal gemessene Aktivität in Prozent an. Unter Verwendung von Cytochrom c entsprechen dem Wert 100 40 mE und bei Verwendung von $K_3Fe(CN)_6$ von 180 mE.

4.3.9 Hemmstoffversuche

Tabelle 6 zeigt die Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die partiell gereinigte APS - Reduktase. Das gereinigte Enzym ist für zahlreiche Hemmstoffe sehr empfindlich.

Voruntersuchungen mit der membrangebundenen APS - Reduktase hatten gezeigt, daß das Enzym von den gleichen Hemmstoffen in weit geringerem Umfang beeinflußt wird.

Tabelle 6: Der Einfluß potentieller Hemmstoffe auf die Aktivität der partiell gereinigten APS - Reduktase aus C.vinosum

Hemmstoff	Testkonzentration (mM)	Aktivität in (%) der Kontrolle: Ferricyanidtest	Cytochrom c - Test
pCMB	3.5	47.6	37.2
	1.0	28.5	23.2
	0.1	85.7	68.9
Jodacetamid	3.5	90.4	96.6
	1.0	93.6	95.7
	0.1	92.1	98.4
NEM	3.5	64.3	33.9
	1.0	83	38.1
	0.1	100	48.7
Arsenit	3.5	100	58.1
	1.0	98.5	81.8
	0.1	95.2	73.2
KCN	3.5	97.6	23.2
	1.0	97.9	23.2
	0.1	98.4	88.4
Azid	3.5	63.1	53.9
	1.0	73.8	54.1
	0.1	97.6	54.8
DNP	3.5	41.6	74.4
	1.0	47.6	67.4
	0.1	76	78

Im Ferricyanid-gekoppelten Test entsprachen 100% Aktivität (Ansatz ohne Hemmstoff) 0.21 Einheiten, im Cytochrom c-gekoppelten Test (aus Candida crusei)0.064 Einheiten.

Die SH-Gruppen - Hemmstoffe pCMB und NEM riefen im Cytochrom c - gekoppelten Test eine starke Inhibierung hervor.
Zu ähnlichen Ergebnissen führten die Untersuchungen von Trüper und Rogers (1971), während Lyric und Suzuki (1970) eine stärkere Hemmung im Ferricyanid-gekoppelten Test nachwiesen.
In den eingesetzten Konzentrationen konnte durch die SH-Inhibitoren keine absolute Hemmung hervorgerufen werden.

Arsenit rief lediglich im Cytochrom c-gekoppelten Test eine partielle Inaktivierung hervor; wurde Ferricyanid als Elektronenakzeptor verwendet, konnte kaum Hemmwirkung festgestellt werden.

Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die Befunde an Thiocapsa roseopersicina und Thiobacillus thioparus; bei den von Trüper und Rogers (1971) und Lyric und Suzuki (1970) untersuchten APS - Reduktasen wirkte Arsenit ebenfalls lediglich im Cytochrom c-gekoppelten Test stark inhibierend.
Die letztgenannten Autoren interpretieren ihre Ergebnisse dahingehend, daß an der Bindung des Elektronenakzeptors eine Dithiolgruppe beteiligt ist.

Für Azid und Cyanid wurde im Ferricyanid-gekoppelten Test kaum signifikante Hemmwirkung vorgefunden, während bei Verwendung von Cytochrom c als Elektronenakzeptor der Hemmeffekt nahezu potenziert wird. Trüper, der bei seinen Untersuchungen zur APS - Reduktase aus Thiocapsa roseopersicina (1971) zu ähnlichen Ergebnissen kam, vermutet deshalb eine Blockierung des cytochromgebundenen Hämanteils, wenngleich er die Möglichkeit der Inaktiverung des freien Cytochrom c im Testansatz nicht ausschließt.

Schwermetallchloride übten sowohl im Ferricyanid-gekoppelten Testsystem wie auch bei Verwendung von Cytochrom c als Elektronenakzeptor eine äußerst starke Hemmung aus.
So reichten 0.1 mM Cd^{2+}, Al^{3+}, und Co^{3+} zur vollkommenen Inaktivierung der APS - Reduktase.
Der Einsatz des Chelatbildners EDTA hingegen führte bis zu einer Konzentration von 3.5 mM zu keiner nennenswerten Inaktivierung des Enzyms. Da es sich bei APS - Reduktasen um Nichthäm-Eisen-Enzyme handelt, ist das Versuchsergebnis einigermaßen überraschend.

4.3.10 Kinetische Untersuchungen

Die Sättigungskurven der Substrate zeigten erwartungsgemäß einen hyperbolischen Verlauf.
Die resultierenden K_m - Werte wurden im Lineweaver - Burk - Diagramm ermittelt.

Im Ferricyanid-gekoppelten Test wurde durch AMP eine deutliche Substrathemmung festgestellt, während dieser Effekt bei Einsatz von Cytochrom c aus Candida crusei auch für die anderen beiden Substrate beobachtet wurde.
Einen ähnlichen Effekt beschrieben bereits Lyric und Suzuki (1970) und Trüper (1971).

Einen Überblick über die erzielten Ergebnisse vermittelt Tabelle 7. Wie die Tabelle verdeutlicht, zeigt die APS - Reduktase bei Verwendung des Elektronenakzeptors Cytochrom c deutlich höhere Affinitäten zu ihren Substraten.
Das kinetische Verhalten des Enzyms deutet auf eine in vivo Beteiligung der Cytochrome hin.
Wegen der geringen spezifischen Aktivitäten konnten keine aussagekräftigen Kinetiken mit den Cytochromen durchgeführt werden, die aus Chromatium gracile isoliert worden waren.

Tabelle 7: K_m-Werte der APS - Reduktase aus Chromatium vinosum

	Test mit	
Substrat	Cytochrom c	Ferricyanid
Cytochrom c	36.6 µM	-
Sulfit	49.5 µM	128 µM
AMP	76.9 µM	133 µM
$Fe(CN)_6^{3-}$	-	389 µM

5. Die ATP - Sulfurylasen aus Thiobacillus denitrificans und Chromatium warmingii

Wie die Durchführung der Wachstumsversuche ergeben hatte, verfügen T.denitrificans und C.warmingii im Gegensatz zu den untersuchten kleineren Vertretern der Chromatiaceae über ungewöhnlich hohe, wachstumsabhängige Aktivitäten einer ATP - Sulfurylase, die mit denen der ADP - Sulfurylase vergleichbar waren.

Eindeutige Aussagen zur Natur und physiologischen Bedeutung der ATP - Sulfurylase in den genannten Organismen erschienen nur möglich, wenn das Enzym von störenden Fremdaktivitäten anderer Enzyme (Pyrophosphatasen, Adenylatkinasen, ADP - Sulfurylasen, APS - Kinasen ect.) befreit werden konnte.

Deshalb wurden die ATP - Sulfurylasen beider Organismen isoliert und weitestgehend gereinigt.

5.1 Anreicherung der ATP - Sulfurylase

5.1.1 Herstellung des zellfreien Extraktes

Die Herstellung des zellfreien Extraktes erfolgte in der unter (II, 3.1) beschriebenen Weise.
Die Aktivität der ATP - Sulfurylase war in beiden Organismen fast ausschließlich im Überstand der Ultrazentrifugation nachzuweisen. Der zellfreie Überstand diente als Ausgangsmaterial der im folgenden beschriebenen Anreicherungsschritte.

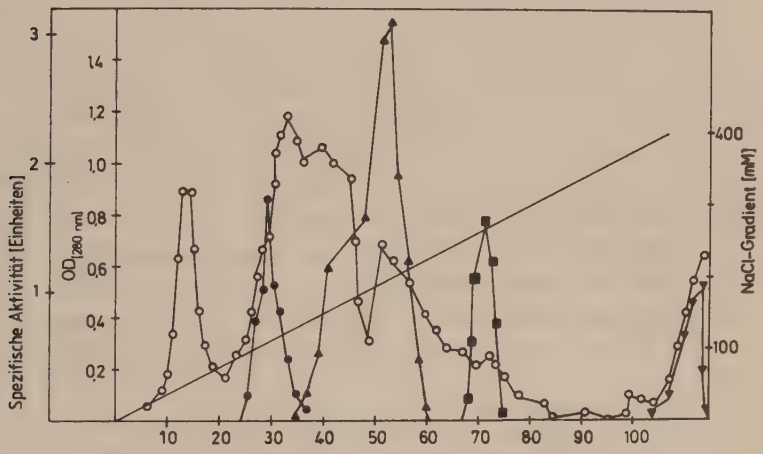
5.1.2 Ionenaustauschchromatographie

Der partikelfreie Überstand wurde durch die Passage über eine Sephadex G 25 - Säule entsalzt und gleichzeitig in einen 2 mM Tris - HCl Puffer, pH 7.8 überführt.
Das Eluat wurde auf einen Anionenaustauscher gegeben (Whatman DE 52, 2 x 12 cm), der zuvor im gleichen Puffer äquilibriert worden war. Zur Entfernung nichtbindenden Proteins wurde die Säule mit 100 ml des Arbeitspuffers gespült, bevor eine stufenweise Erhöhung der Pufferkonzentration (5, 10, 15 und 20 mM) vorgenommen wurde.
Der Austritt schwachbindender Proteine aus der Säulenmatrix wurde mit Hilfe eines Monitors mit angeschlossenem Schreiber (Chromato-

graphiesystem der Firma LKB) beobachtet.
Die ATP - Sulfurylasen aus T.denitrificans und C.warmingii wurden über einen kontinuierlichen NaCl - Gradienten (0 - 300 resp. 0 - 400 mM NaCl, suspendiert in 20 mM Tris - HCl, pH 7.8) aus der Matrix eluiert.

Aus den Abbildungen 15 und 16 geht hervor, daß beide ATP - Sulfurylasen unter ähnlichen Bedingungen eluiert und von den Begleitproteinen weitgehend befreit werden.

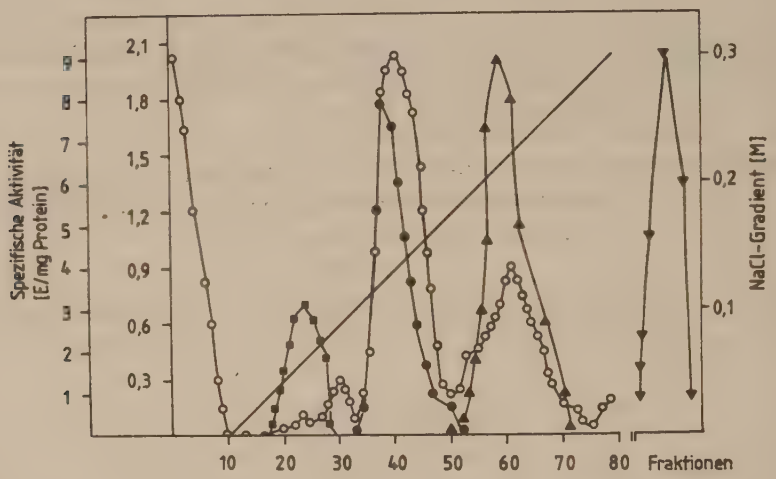
Abbildung 15: Trennung der ATP - Sulfurylase aus C.warmingii von störenden Begleitproteinen durch Anionenaustauschchromatographie



Legende:
- Proteinverteilung
- Aktivität der Adenylatkinase
- Aktivität der ADP - Sulfurylase
- Aktivität der ATP - Sulfurylase
- Aktivität der Pyrophosphatase

Die Fraktionen mit Gehalt an ATP - Sulfurylase wurden vereinigt und mit Hilfe einer Sephadex G 25 - Säule entsalzt. Das Enzym wurde im folgenden einer fraktionierten $(NH_4)_2SO_4$-Fällung unterworfen.

Abbildung 16: Trennung der ATP - Sulfurylase aus T.denitrificans von störenden Begleitproteinen durch Anionenaustauschchromatographie



Legende:

- Proteinverteilung
- Aktivität der Adenylatkinase
- Aktivität der ADP - Sulfurylase
- Aktivität der ATP - Sulfurylase
- Aktivität der Pyrophosphatase

5.1.3 Ammoniumsulfatfällung

Das Ammoniumsulfat wurde dem eisgekühlten Extrakt in mehreren Schritten unter leichtem magnetischen Rühren zugesetzt.
Das ausgeflockte Protein jedes Fällungsschrittes wurde durch Zentrifugation (Sorvall RC 2B, 10 000 UpM für 10 min) sedimentiert, in geringen Quantitäten eines 50 mM Tris - HCl Puffers vom pH 8 resuspendiert und im Photometer auf Aktivität untersucht.
Wie die Versuchsergebnisse zeigten, wurde die ATP - Sulfurylase aus T.denitrificans in einem Sättigungsbereich zwischen 55 und 80%, die aus C.warmingii zwischen 40 und 70% gefällt.
Zur weiteren Reinigung wurde der aktive Extrakt einer Gelfiltration unterworfen.

5.1.4 Gelfiltration

Die aktiven Ammoniumsulfatfraktionen wurden auf eine Sephadex S 200 - Säule (1.2 x 84 cm) aufgetragen, die in 50 mM Tris - HCl Puffer vom pH 8 äquilibriert worden war.
Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen und spektralphotometrischen Tests auf Gehalt an ATP - Sulfurylase unterzogen.

Wie die Auswertung ergab, wurde das Enzym bei beiden Organismen in einem relativ engen Bereich (4 resp. 5 Fraktionen) eluiert und von anderen Proteinen weitgehend abgetrennt.

Der erhaltene Extrakt an ATP - Sulfurylase war frei von Fremdaktivitäten (ADP - Sulfurylase, Adenylatkinase, Pyrophosphatase); er wurde zur Bestimmung der physikochemischen Eigenschaften des Enzyms verwendet.

Während das Enzym aus T.denitrificans selbst im stark verdünnten Zustand ohne größeren Aktivitätsverlust (>10%) über mehrere Wochen bei -18°C gelagert werden konnte, war die ATP - Sulfurylase aus C.warmingii auch in höheren Proteinkonzentrationen nur bedingt und unter rascher Abnahme der spezifischen Aktivität haltbar. Deshalb wurden die kinetischen Untersuchungen mit diesem Extrakt vorzugsweise im Anschluß an die erfolgte Reinigung durchgeführt.
Eine Übersicht über die Anreicherung der ATP - Sulfurylase aus T.denitrificans gibt Tabelle 8.

Tabelle 8: Anreicherung der ATP - Sulfurylase aus Thiobacillus denitrificans RT

Anreicherungsschritt	Protein	ATP - Sulfurylase - aktivität (E/mg Protein)	Anreicherung
Ultrazentrifuge: Überstand	710	0.992	1
Anionenaustauscher	66.5	8.986	13.2
55 - 80% $(NH_4)_2SO_4$	20.01	18.99	27.52
Gelfiltration	4.15	57.44	83.25

Die über adäquate Schritte angereicherte ATP - Sulfurylase aus C.warmingii wies am Ende des Reinigungsvorganges eine spezifische Aktivität von 3.7 Einheiten auf, wobei eine Enzymausbeute von 28.3% erreicht wurde.

5.2 Charakterisierung der ATP - Sulfurylasen aus T.denitrificans und C.warmingii

5.2.1 Stöchiometrie der ATP - Sulfurylasereaktionen

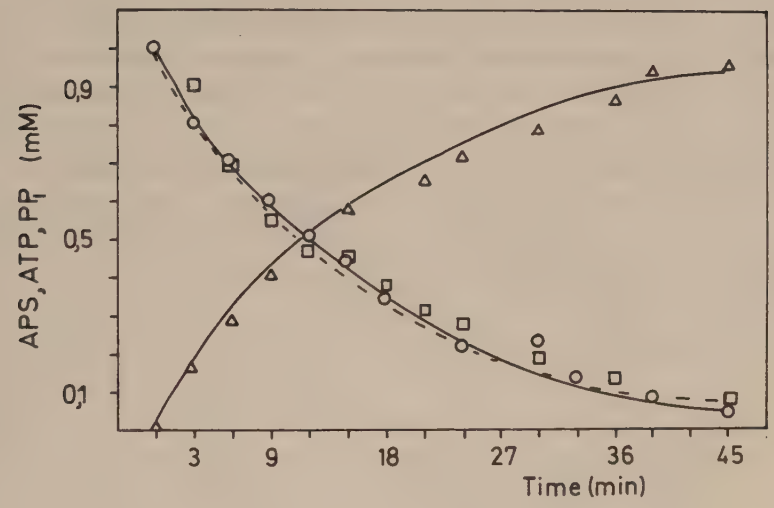
Die Stöchiometrie der ATP - Sulfurylase wurde in der physiologisch günstigeren Syntheserichtung (Bildung von ATP aus APS und PP_i) gemessen und überprüft.

Der Reaktionsansatz zur Bestimmung der Stöchiometrie enthielt 1 mM APS, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM $Na_4P_2O_7$, 10 mM KCl, 0.1 M Tris - HCl Puffer vom pH 8 und das gereinigte Enzym in einem Gesamtvolumen von 15 ml. Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert und durch Zugabe des Enzymextraktes gestartet, wobei ein Magnetrührer für eine gleichmäßige und rasche Verteilung im Ansatz sorgte.
Zu Beginn des Versuches und in 3 min Intervallen wurden dem Ansatz Proben entnommen, deren Enzymaktivität durch sofortiges Kochen abgestoppt wurde. Ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugation in einer Haereus Christ Tischzentrifuge (4 000 UpM/10 min) sedimentiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung von noch nicht umgesetztem APS und PP_i, sowie gebildetem ATP verwendet (II, 2.1 und II, 3.2.4.1).
Wie die Versuchsauswertungen für beide Organismen ergaben, nehmen die Konzentrationen für APS und PP_i in gleichen Zeitintervallen um nahezu identische Mengen ab, wobei es pro Mol umgesetztem Substrat zur Bildung von 1M ATP kommt.
Aus Abbildung 17 geht hervor, daß das Verhältnis von umgesetzten Substraten zum geformten Produkt ATP in keinem Fall wesentlich von dem erwarteten Verhältnis 1:1 abweicht.

5.2.2 pH - Optima der ATP - Sulfurylasen

Das pH - Optimum der Reaktion wurde durch Endpunktbestimmung (II, 2.1) im Zeiss PM 4 ermittelt. In einer Reihe von Parallelmessungen

Abbildung 17: Untersuchungen zur Stöchiometrie der ATP - Sulfurylase aus T.denitrificans



Legende: Gehalt an APS —○—○— Gehalt an PP_i —□—□—
Gehalt an ATP —△—△—

wurde der pH - Wert des Ansatzes unter Verwendung eines 100 mM Tris - HCl Puffers unter sonst identischen Bedingungen bei einer Testtemperatur von 25°C variert.
In beiden Organismen war die ATP - Sulfurylase über den gesamten getesteten pH - Bereich von pH 7 bis pH 9.6 aktiv.
Maximale Aktivität wurde bei T.denitrificans bei einem pH von 8 und bei C.warmingii bei pH 7.5 ermittelt.

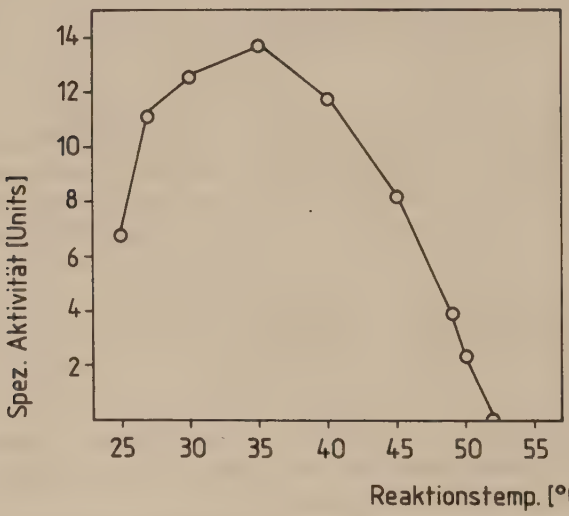
5.2.3 Temperaturoptima

Die Temperaturoptima der ATP - Sulfurylase wurden durch Endpunktbestimmung (II, 2.1) ermittelt.
In einer Serie von Meßansätzen wurde der vollständige Reaktionsansatz bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert, bevor die

Reaktion durch Zugabe der ATP - Sulfurylase gestartet wurde. Zu destinkten Zeiten (2, 3 und 5 min nach Testbeginn) wurden die Proben durch Kochen abgestoppt, und nach Sedimentation des ausgefällten Proteins wurde die Menge an gebildetem ATP bestimmt.

Für beide Enzyme wurden sehr ähnliche Ergebnisse ermittelt. So zeigten sie oberhalb von 50°C nur noch geringe Aktivität.

Abbildung 18: Ermittlung der optimalen Reaktionstemperatur der ATP - Sulfurylase aus Thiobacillus denitrificans



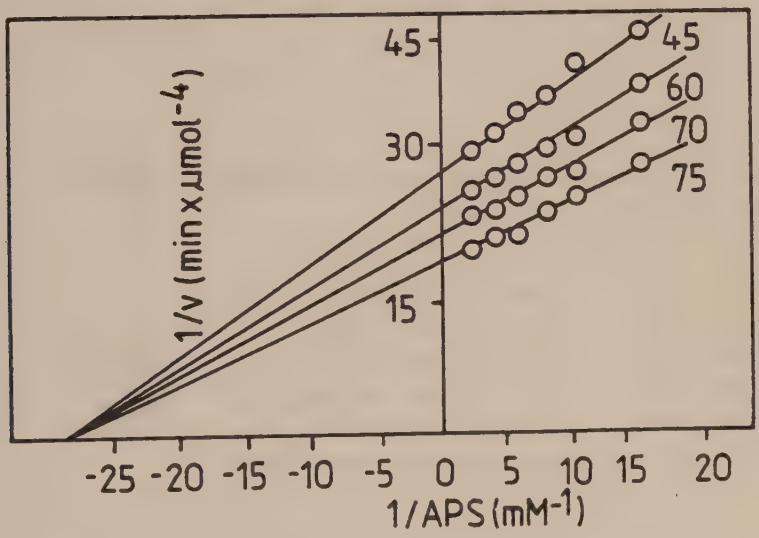
Eine maximale Umsetzung der Substrate wurde für die ATP - Sulfurylase aus T.denitrificans bei 35°C, bei der aus C.warmingii bei 37°C ermittelt.
Die Enzyme beider Organismen wurden bei Temperaturen oberhalb von 40°C rasch inaktiviert; bei 55°C fand kein Substratumsatz mehr statt.

5.2.5 Substratsättigungskurven für APS und PP_i

Die Substratsättigungskurven beider Substrate zeigten für die ATP - Sulfurylasen aus C.warmingii und T.denitrificans erwartungsgemäß hyperbolischen Verlauf.
Die Abbildungen 19a und 19b zeigen die Substratsättigungskurven für T.denitrificans in der Lineweaver-Burk-Auftragung.
Danach konnte der K_m-Wert für APS mit 0.079 mM angegeben werden.
Für C.warmingii wurde ein K_m(APS) von 0.063 mM ermittelt.

Abbildungen 19a + b: Substratsättigungskurven für APS (19a) und PP_i (19b) für die ATP - Sulfurylase aus T. denitrificans im Lineweaver-Burk-Diagramm

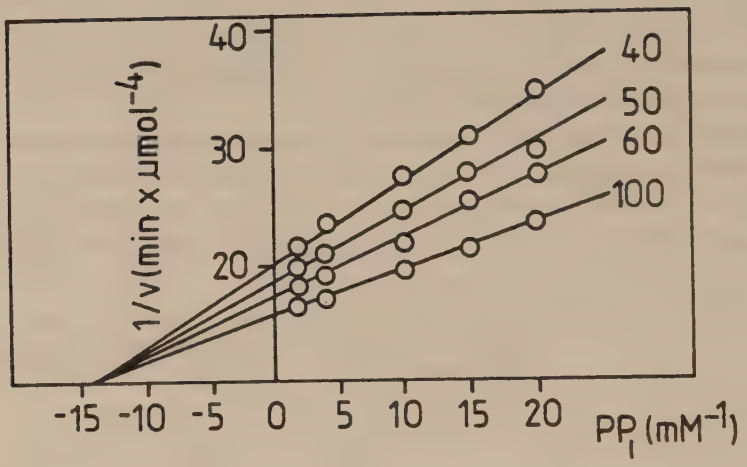
19a



Die neben den 4 Geraden angegebenen Zahlen nehmen Bezug auf die Einsatzmenge von Pyrophosphat pro Testansatz. Dabei wurden die Konzentrationen in µM angegeben.

Bei der Aufnahme der Pyrophosphatkinetik für die ATP - Sulfurylase aus T.denitrificans wurden die Pyrophosphatkonzentrationen in den Reaktionsansätzen zwischen 0.4 mM und 0.05 mM bei gleich-

19b



Die neben den Geraden befindlichen Werte geben die Konzentrationen von APS in µM an.

zeitiger Veränderung des APS - Gehaltes variiert.
In der Lineweaver-Burk-Auftragung wurden 4 Geraden erhalten, die sich alle in einem Punkt auf der Abszissenachse schnitten.
Der $K_m(PP_i)$ wurde mit 0.0174 mM bestimmt.
Nach dem gleichen Verfahren wurde der K_m-Wert für die ATP - Sulfurylase aus C.warmingii mit 0.083 mM errechnet.

5.2.5 Untersuchungen zum Einfluß von Schwefelverbindungen und Adenylaten auf die dissimilatorischen ATP - Sulfurylasen

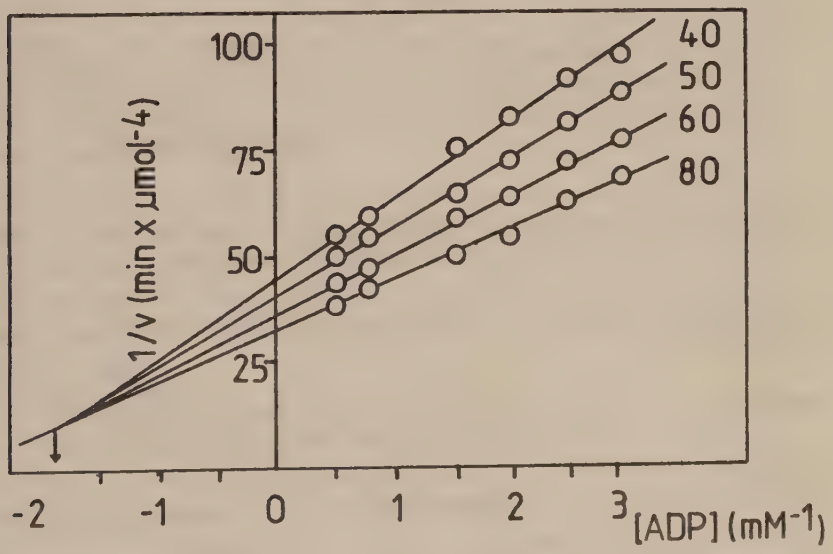
Die Erstellung von Hemmkinetiken mit verschiedenen Adenylaten und Schwefelverbindungen sollte einen Aufschluß darüber geben, ob diese Substanzen möglicherweise einen regulativen Effekt auf die Aktivität der ATP - Sulfurylasen auszuüben vermögen.
In mehreren parallel durchgeführten Meßreihen wurden den Ansätzen unterschiedlich hohe Konzentrationen der zu überprüfenden Substanzen beigesetzt.

Die Ansätze unterschieden sich voneinander in ihrem Gehalt an Pyrophosphat (Variation der Konzentration zwischen 40 und 80 µM); die Konzentration von APS wurde in allen Messungen bei 0.25 mM konstant gehalten.

Die graphische Versuchsauswertung zur Ermittlung des Hemmtyps erfolgte im Lineweaver-Burk-Diasgramm, während die Inhibitorkonstante dem entsprechenden Sekundärdiagramm oder dem speziell für Hemmkinetiken entwickelten Dixon-Plot entnommen wurde.

Die Abbildungen 20 a-c demonstrieren die graphische Testauswertung am Beispiel des ADP - Einflusses auf die ATP - Sulfurylase aus Thiobacillus denitrificans.

Abbildung 20a: Ermittlung der ADP - Inhibitorkonstante im Dixon-Plot

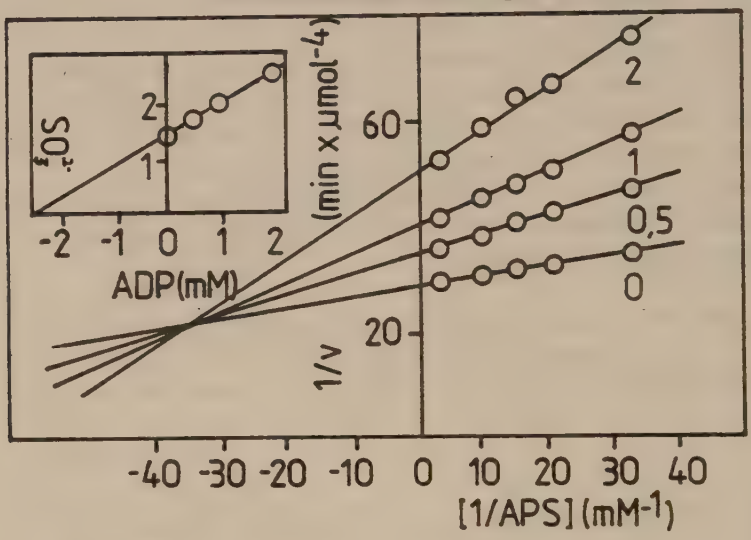


Nach dem von Dixon (1953) für die Darstellung von Hemmkinetiken eingeführten Diagramm wird der Inhibitor unter jeweils für eine Meßreihe konstant gehaltenen Substratkonzentrationen variiert.

Der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden im 2. Quadranten gibt mit seiner Abszissenkoordinate direkt den Wert $-K_i$ an.

Die neben den Geraden befindlichen Daten geben die Pyrophosphatkonzentration im Reaktionsansatz in µM an.

Abbildungen 20b + c: Ermittlung des Hemmtyps und der Inhibitorkonstante bei Einfluß von ADP auf die ATP - Sulfurylase durch das Lineweaver-Burk-Diagramm und das daraus hervorgehende Sekundärdiagramm



Die neben den Geraden befindlichen Zahlen geben (in mM) die Testkonzentrationen von ADP in den einzelnen Ansätzen wieder.

Eine Übersicht über die erhaltenen Inhibitorkonstanten gibt Tabelle 9.

Tabelle 9 : Kinetische Daten zu den dissimilatorischen ATP - Sulfurylasen

Kinetische Daten	C.warmingii			T.denitrificans		
K_m für APS	0.063	mM		0.0709	mM	
K_m für PP_i	0.083	mM		0.0174	mM	
K_i für S^{2-}	0.73	mM	(kompetitiv)	0.219	mM	(kompetitiv)
K_i für SO_3^{2-}	1.15	mM	(kompetitiv)	2.8	mM	(kompetitiv)
K_i für SO_4^{2-}	0.92	mM	(kompetitiv)	4.5	mM	(kompetitiv)
K_i für AMP	0.966	mM	(kompetitiv)	2.5	mM	(kompetitiv)
K_i für ADP	1.2	mM	(nichtkompetitiver Hemmtyp	1.83	mM	(nichtkompetitiver Hemmtyp)

5.2.6 Bestimmung des Molekulargewichtes

Das Molekulargewicht wurde durch Gelfiltration nach der unter (II, 4.4.1) beschriebenen Methode an Sephadex S 300 ermittelt.

Danach wurde für die ATP - Sulfurylase aus T.denitrificans das Molekulargewicht mit 215 000 bestimmt, während das Enzym aus C. warmingii ein Molekulargewicht von 260 000 hat.

6 Eigenschaften der untersuchten ADP - Sulfurylasen

Im Gegensatz zu den mehr oder minder fest an die Chromatophoren gebundenen APS - Reduktasen der untersuchten phototrophen Bakterien konnten die ADP - Sulfurylasen nach vorausgehender Ultrazentrifugation leicht im Aufschlußüberstand nachgewiesen und aus diesem angereichert werden.

Um gesicherte Aussagen über die kinetischen und physikochemischen Eigenschaften der ADP - Sulfurylasen tätigen zu können, mußten die Enzyme zumindest partiell gereinigt werden.
Dabei kam es vor allem auf die Abtrennung von Enzymen an, die einen Einfluß auf die Aktivitäten der ADP - Sulfurylasen zu nehmen vermochten.

Stellvertretend für alle anderen gereinigten ADP - Sulfurylasen soll der Reinigungsgang des aus C.warmingii isolierten Enzyms aufgezeigt werden. Für die anderen ADP - Sulfurylasen konnten mit geringen Abweichungen die gleichen Reinigungsschritte verwendet werden.
Nach erfolgter Anreicherung wurden die Enzyme bezüglich ihrer physikalischen und kinetischen Eigenschaften miteinander verglichen.

6.1 Anreicherung der ADP - Sulfurylase aus C.warmingii

6.1.1 Herstellung des zellfreien Extraktes

Die Gewinnung des zellfreien Matrials erfolgte nach der unter (II, 3.1) beschriebenen Methode. Für die Anreicherung der ADP - Sulfurylase wurde der vollkommen chromatophorenfreie Überstand der Ultrazentrifugation verwendet, da er fast die gesamte Aktivität enthielt.

6.1.2 Anionenaustauschchromatographie I

Wie aus Voruntersuchungen hervorging, die mit allen zu testenden ADP - Sulfurylasen durchgeführt worden waren, sind die Enzyme in geringen Proteinkonzentrationen äußerst instabil.
Ziel der Anreicherung mußte somit sein, die ADP - Sulfurylase aus C.warmingii mit hoher Proteinkonzentration in einem größtmöglich vorgereinigten Zustand in kurzer Zeit anzureichern.

Der Extrakt wurde vorsichtig mit 0.1 N HCl auf einen pH - Wert von 7.6 eingestellt und auf einen Anionenaustauscher (Whatman DE 52) geladen, der in einem 20 mM Tris - HCl Puffer gleichen pH - Wertes äquilibriert worden war.
Die Säulenmatrix wurde mit dem zweifachen Puffervolumen des Elutionspuffers nachgewaschen, bevor das Enzym unter Verwendung einer 0.3 M NaCl - Lösung von der Matrix abgetrennt wurde.
Das Enzym befand sich anschließend in einem geringen Volumen von verhältnismäßig hoher Proteinkonzentration.
Durch Abtrennung der nichtbindenden und der stärker an die Matrix bindenden Proteine konnte in der Regel eine 2 - 3fache Anreicherung erzielt werden.
Zur Konzentrierung der ADP - Sulfurylasen wurde nicht auf die Methode der Ammoniumsulfatfällung zurückgegriffen, da das Enzym meistens in einem weiten Sättigungsbereich sedimentierte und somit nur eine geringe Anreicherung zustande kam.

6.1.3 Gelfiltration

Zur weiteren Anreicherung wurde das aktive Eluat der 1. Anionenaustauschersäule zur Gelfiltration auf eine Sephadex G 150 - Säule aufgetragen, die in 20 mM Tris - HCl Puffer vom pH 8 äquilibriert worden war und als zusätzlichen Stabilisator 1 mM DTE enthielt.

6.1.4 Anionenaustauscherchromatographie II

Die aktiven Fraktionen der Gelfiltration wurden vereinigt und erneut auf eine DE 52 - Säule gegeben, die zuvor in dem gleichen Puffer äquilibriert worden war.
Durch Anschluß eines linearen NaCl - Gradienten (100 - 300 mM NaCl, suspendiert im Elutionspuffer), wurde die ADP - Sulfurylase in der Regel in einem Konzentrationsbereich zwischen 120 - 180 mM von der Säulenmatrix abgetrennt.

Die erhaltenen aktiven Fraktionen wurden, mit Ausnahme der Spitzenfraktionen, vereinigt und mittels Ultrafiltration konzentriert.

Die Spitzenfraktionen wurden jeweils zur Aufnahme der Reaktionskinetiken herangezogen.

6.2 Aussagen zur Reinheit der gewonnenen Präparate

Die angereicherten ADP - Sulfurylasen wurden zur Feststellung des Reinheitsgrades einer Disk - Gelelektrophorese (II, 4.5) und einer isoelektrischen Fokussierung (II, 4.7) unterworfen.

Dabei zeigte es sich, daß keine der angereicherten ADP - Sulfurylasen als homogenes Präparat vorlag.
Je nach Herkunft konnten zwischen 3 (Chromatium warmingii) und und 7 Proteinbanden (Chromatium gracile) in der aufgetragenen Probenmenge lokalisiert werden.

Die enzymatischen Tests zeigten jedoch, daß die Präparate frei von Adenylatkinase, ATP - Sulfurylase, APS - Kinase und Pyrophosphatase waren. Eine Beeinflussung der Kinetiken durch Fremdproteine konnte somit ausgeschlossen werden.

6.3 Charakterisierung der ADP - Sulfurylasen

6.3.1 Einfluß von Molarität und pH - Wert des Tris - HCl Puffers auf die Aktivität der ADP - Sulfurylasen

In einer Serie von Meßansätzen wurden der Einfluß von Molarität und pH des Puffers auf die partiell gereinigten ADP - Sulfurylasen untersucht.

Die dazu notwendigen Versuche wurden bei 25°C in einem temperier-

ten Wasserbad durchgeführt; die 1 ml-Ansätze enthielten außer der in Molarität und pH variierenden Puffersubstanz jeweils 0.5 mM APS, P_i und $MgCl_2$.
Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und nach einer Reaktionszeit von 1, 2 und 3 min durch Kochen abgestoppt.

Wie die Versuchsauswertungen ergaben, nahm die Aktivität der ADP - Sulfurylasen bei allen untersuchten Organismen mit steigender Tris-Konzentration (< 50 mM) ab.
Deshalb wurden die folgenden Untersuchungen bei einer Pufferkonzentration von 20 mM durchgeführt.

Die ADP - Sulfurylasen verfügen über unterschiedliche pH - Optima. Zwar waren alle Enzyme im gesamten getesteten pH - Bereich zwischen 7.5 und 9.6 aktiv, doch zeigten die einzelnen ADP - Sulfurylasen der Chromatiaceae bei unterschiedlichen pH - Werten maximale Aktivität. Eine Übersicht über die ermittelten pH - Optima vermittelt Tabelle 10.

Tabelle 10: pH - Optima der untersuchten ADP - Sulfurylasen

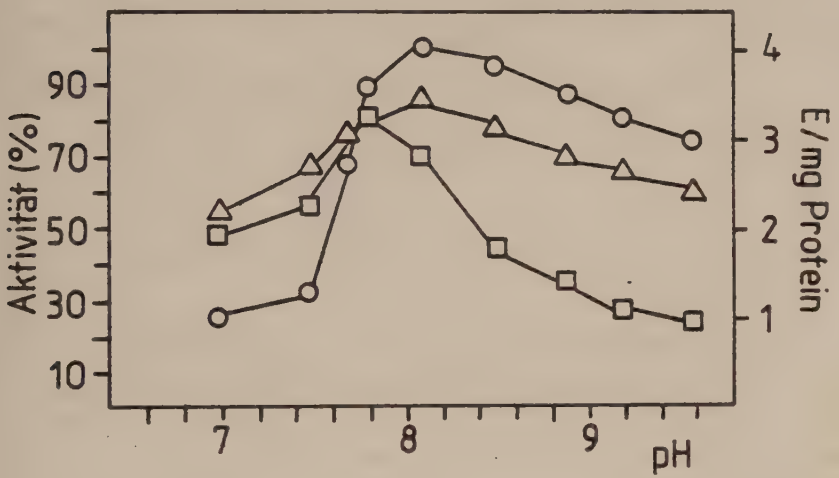
Organismus	pH - Optimum
C.gracile	9.3
C.warmingii	8.9
C.vinosum	8.5
C.minutissimum	8.1

Abbildung 21 faßt den Einfluß der Tris - HCl Puffer auf die Aktivität der ADP - Sulfurylasen aus C.minutissimum zusammen.

6.3.2 Temperaturoptima

Das Temperaturoptimum der entsprechenden ADP - Sulfurylase wurde durch Endpunktbestimmung ermittelt.
Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Parallelansätzen erstellt, die in einem Volumen von 1 ml 0.5 mM APS, 0.5 mM P_i und 20 mM Tris - HCl Puffer (pH 8) neben dem Enzymextrakt enthielten.

Abbildung 21: Einfluß unterschiedlicher Tris - HCl Puffer auf die ADP - Sulfurylase von C.minutissimum



Zeichenerklärung: Aktivität mit 100 mM Tris - HCl Puffer
Aktivität mit 50 mM Tris - HCl Puffer
Aktivität mit 20 mM Tris - HCl Puffer

Die entsprechenden Meßansätze wurden für jeweils 5 min bei den Testtemperaturen (25°C - 70°C) vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe des Extraktes gestartet wurde.

Nach 15 min wurde die Reaktion durch Kochen terminiert, ausgefälltes Protein abgetrennt und im proteinfreien Überstand die Menge an gebildetem ADP (II, 2.2) bestimmt.

Die unter den beschriebenen Testbedingungen ermittelten Ergebnisse sind in der Tabelle 11 zusammenfassend dargestellt.

Die ADP - Sulfurylase aus C. minutissimum erwies sich als geringfügig temperaturstabiler als die übrigen untersuchten Enzyme. Die aus C.warmingii und C.vinosum isolierten ADP - Sulfurylasen unterschieden sich bezüglich ihres Temperaturverhaltens kaum voneinander.

Tabelle 11: Untersuchungen zu Temperatureinfluß auf die ADP - Sulfurylasen der Chromatiaceae

	Organismen			
	C.gracile	C.warmingii	C.vinosum	C.minutissimum
Temp.-Optimum	35°C	35°C	37°C	40°C
T_{50}	48°C	37°C	41°C	51°C
Inaktivierung bei	60°C	55°C	55°C	65°C

6.3.3 Stöchiometrie der ADP - Sulfurylasereaktion

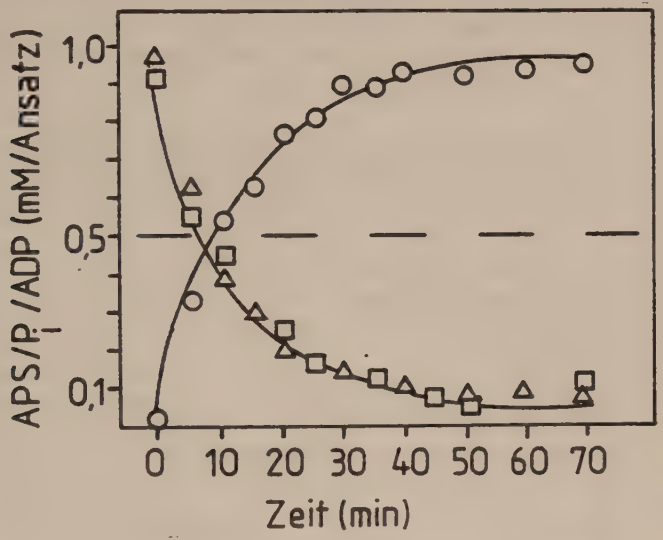
Zum Beweis für die allgemeine Gültigkeit der Reaktionsgleichung wurden mit den partiell gereinigten ADP - Sulfurylasen Untersuchungen zur Reaktionsstöchiometrie vorgenommen.

Der Ansatz zur Überprüfung der Reaktionskinetik umfaßte in einem Gesamtvolumen von 25 ml die folgenden Komponenten:
20 mM Tris - HCl Puffer, pH 8, 1 mM APS, 1 mM P_i und Enzymextrakt.

Die Substanzen wurden bei 30°C in einem temperierten Wasserbad für 5 min vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von APS gestartet wurde. Ein Magnetrührer sorgte für die sofortige und gleichmäßige Verteilung des Substrates.

Unmittelbar nach Substratzugabe sowie alle weiteren 5 min wurden dem Ansatz 1 ml-Proben entnommen, deren Enzymaktivität durch Kochen abgestoppt wurde. Das ausgefällte Protein wurde unter Verwendung eines Sartorius - Membranfilters (Porengröße 0.1 µm) unter Einsatz einer Wasserstrahlpumpe von den löslichen Komponenten abgetrennt.
Dem aufgefangenen proteinfreien Filtrat wurden adäquate Anteile zur Bestimmung des Gehaltes an APS (II, 2.1), ADP (II, 2.2) und P_i (II, 3.2.4.1) entnommen.
Wie die Auswertungen zeigten, wichen die enzymkatalysierten Umsätze zu keinem Zeitpunkt des Versuchsablaufs von den erwarteten Ergebnissen ab.

Abbildung 22: Stöchiometrie der ADP - Sulfurylasereaktion



Legende: APS, ADP, P_i

Die Untersuchungen zur Stöchiometrie wurden mit einem 39fach angereichertem Extrakt von C.minutissimum (Proteingehalt 0.69 mg/ml) durchgeführt.

Der Umsatz von 1 µmol der Substrate APS und P_i fand seine Entsprechung in der Entstehung von 1 µmol ADP.

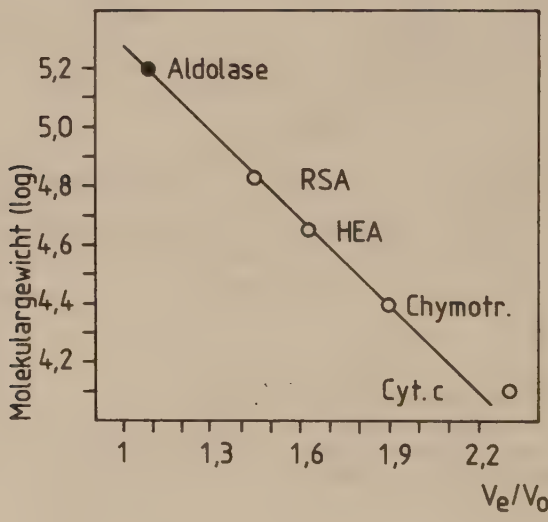
Abbildung 22 dokumentiert den zeitlichen Verlauf der Reaktionskinetik am Beispiel der ADP - Sulfurylase aus C.minutissimum.

6.3.4 Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der partiell gereinigten ADP - Sulfurylasen wurde durch Gelfiltration an Sephadex S 200 bestimmt.
Durch Vergleich der Elutionsvolumina der der Combithek II (Boehringer Mannheim) entnommenen Eichproteine (II, 4.4.1) mit den Elutionsvolumina der aktiven ADP - Sulfurylasen wurde auf das Molekulargewicht geschlossen.

So eluierte das Enzym aus C.minutissimum unter den gewählten Bedingungen wie die Aldolase in der 54. Fraktion. Beide Enzyme verfügen offensichtlich über identische Molekulargewichte (158 000).

Abbildung 23: Bestimmung des Molekulargewichtes der ADP - Sulfurylase aus C.minutissimum durch Gelfiltration an einer Sephadex S 200 - Säule



Sammelvolumen: 50 Tropfen/Fraktion (1.6 ml); Fließgeschwindigkeit 4.8 ml/h. Die effektive Säulenhöhe betrug 80 cm.
Aldolase und ADP - Sulfurylase (●) eluierten in einer Fraktion.

Einen Überblick über die Molekulargewichte der isolierten ADP - Sulfurylasen vermittelt Tabelle 12.

Tabelle 12: Molekulargewichte der ADP - Sulfurylasen

	Ermitteltes Molekulargewicht für			
	C.gracile	C.warmingii	C.vinosum	C.minutissimum
Molekulargewicht	200 000	195 000	176 000	158 000

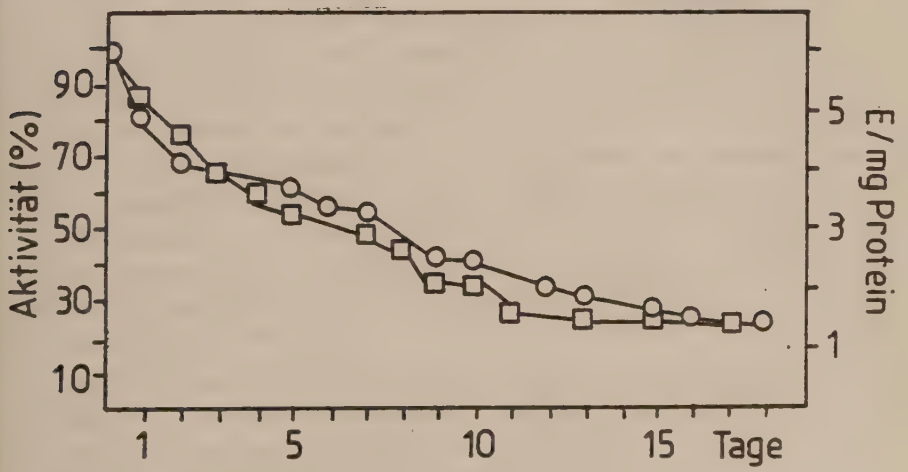
6.3.5 Lagerungsfähigkeit der gereinigten ADP - Sulfurylase

Drei der vier untersuchten ADP - Sulfurylasen verloren während der Lagerung bei -18°C rasch einen hohen Prozentsatz ihrer Ausgangsaktivität.
Eine Ausnahme bildete lediglich das aus C.minutissimum isolierte Enzym, welches auch nach einer einmonatigen Lagerungszeit noch über ca. 30% seiner ursprünglichen Aktivität verfügte.

Die anderen ADP - Sulfurylasen verloren, wenn sie bei ähnlichen Proteinkonzentrationen (0.18 mg/ml) gelagert wurden, innerhalb weniger Tage fast vollständig ihre kinetischen Fähigkeiten.

Ein gewisser Schutz gegen die drastische Aktivitätsminderung wurde durch Erhöhung der Proteinkonzentration der Enzymlösungen erreicht, was entweder durch Einengen des Extraktes über Ultrafiltration geschah oder durch Zugabe von Rinderserumalbumin (5 mg/ml) zum gereinigten Enzym erreicht wurde.

Abbildung 24: Aktivitätsverlust während der Lagerung der ADP - Sulfurylase aus C.minutissimum



Legende: □ Frisch aufgetauter Extrakt
○ Wiederholt aufgetauter Extrakt

Ein 32fach angereicherter Enzymextrakt aus C.minutissimum mit

einem Proteingehalt von 0.18 mg/ml wurde auf 25 Zentrifugenröhrchen verteilt. Während diese Röhrchen jeweils 0.2 ml Extrakt enthielten, befanden sich in einem 26. Röhrchen 5 ml Extrakt.
An jedem Versuchstag wurde eines der 25 Röhrchen aufgetaut und die spezifische Aktivität des Extraktes über den photometrischen Test (II, 3.2.2) bestimmt. Der gleiche Vorgang wurde mit dem 5 ml Extraktröhrchen durchgeführt. Das darin enthaltene Enzym wurde nach Feststellung der Aktivität wieder eingefroren, um dann am nächsten Tag erneut aufgetaut und untersucht zu werden.
Da beide Probeansätze über die gleiche Ausgangsaktivität bei gleicher Proteinkonzentration verfügten, sollte bei auftretenden Aktivitätsverlusten festgestellt werden, ob diese lediglich von der Länge der Lagerungszeit abhängig sind, oder ob der Prozeß des dauernden Auftauens und Wiedereinfrierens aktivitätsmindernd wirkt.

Wie der Abbildung 24 zu entnehmen ist, nimmt die Aktivität in beiden Testansätzen mit der Zeit in etwa gleichem Umfang ab. Der Aktivitätsverlust ist demnach primär auf die Länge der Lagerungszeit zurückzuführen, während sich das Enzym einem fortgesetzten Einfrieren und Wiederauftauen gegenüber weitgehend inert verhält.

6.3.6 Aufnahme der Substratsättigungskurven

In Vorversuchen wurden die Substratsättigungskurven für APS und P_i dergestalt aufgenommen, daß die Konzentration des einen Substrates konstant gehalten wurde, während das andere Substrat in unterschiedlichen Konzentrationen dem Reaktionsansatz zugefügt wurde. Die so gewonnenen Substratsättigungskurven für APS und P_i zeigten bei allen untersuchten Vertretern der Chromatiaceae hyperbolischen Verlauf. Durch Übertragung der Meßdaten in das Lineweaver - Burk-Diagramm wurde der vorläufige K_m-Wert ermittelt.

Zur genaueren Überprüfung wurden bei den eigentlichen Aufnahmen der Kinetiken die Substratmengen des einen Parameters in einem Sättigungsbereich zwischen 30 und 70% gehalten und die Menge des 2. Substrates so variiert, daß für jede Meßreihe bei einer definierten Substratkonzentration mindestens 5 Meßpunkte vorlagen.

Die durch Endpunktbestimmung (II, 2.2) ermittelten Ergebnisse wurden im Lineweaver - Burk Diagramm graphisch aufgetragen und zur

K_m-Wert - Bestimmung herangezogen.
Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 13: Die K_m-Werte der ADP - Sulfurylasen

	C.gracile	C.warmingii	C.vinosum	C.minutissimum
K_m-Wert für (APS)	0.263 mM	0.392 mM	0.152 mM	0.77 mM
K_m-Wert für (P_i)	0.109 mM	0.045 mM	0.256 mM	0.14 mM

7 Die Adenylatkinasen

7.1 Anreicherung der Adenylatkinasen

Die Adenylatkinasen der untersuchten Organismen wurden mit hohen spezifischen Aktivitäten nach Ultraschallbehandlung in den löslichen Proteinfraktionen nachgewiesen.
Der chromatophorenfreie Überstand der Ultrazentrifugation (II, 3.1) diente als Ausgangsmaterial für die einzelnen Anreicherungsschritte.

Die Anreicherung erfolgte über Ionenaustauschchromatographie, Ammoniumsulfatfraktionierung und Gelfiltration oder wie im Falle der Adenylatkinasen aus C.warmingii und T.denitrificans über Ionenaustauschchromatographie, Ammoniumsulfatfällung und Affinitätschromatographie.

Eine Übersicht über die verwendeten Anreicherungsmethoden zur Reinigung der Adenylatkinase aus C.warmingii vermittelt Abbildung 25, während Tabelle 14 die Anreicherungsschritte und die Effizienz bei der Reinigung der Adenylatkinase aus T.denitrificans widerspiegelt.

Nach der erfolgreich durchgeführten Enzymreinigung wurden für die

Tabelle 14: Beispiel eines typischen Reinigungsganges für die Adenylatkinase aus Thiobacillus denitrificans

Arbeitsgang	Volumen (ml)	Gesamtprotein (mg)	Protein (mg/ml)	Aktivität (E/ml)	Gesamtaktivität (E)	Spez. Aktivität (E/mg Pr.)	Reinigungsfaktor	Ausbeute (%)
S_{10}	40	1312	32.8	15.18	607.3	0.463	1	100
S_{144}	34	588	17.3	15.63	531.1	0.903	1.95	87.4
Anionenaustauscher	18	214.5	11.9	25.4	456.8	2.13	4.6	75.2
$(NH_4)_2SO_4$ 55 - 80% Sättigung	3	51.3	17.1	104.86	275	5.36	11.6	45.3
Sepharose 4B	10.5	1.9	0.181	18.57	195	102.8	222	32.1

Abbildung 25: Anreicherungschema der Adenylatkinase aus Chromatium warmingii

Adenylatkinasen folgende spezifischen Aktivitäten bestimmt:

Adenylatkinase aus	Chromatium gracile	31.03 E/mg Protein
	Chromatium minutissimum	40.25 E/mg Protein
	Chromatium vinosum	24.16 E/mg Protein
	Chromatium warmingii	13.64 E/mg Protein
	Thiobacillus denitrificans	24.3 E/mg Protein

Mit den gewonnenen Enzympräparaten wurden die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen zur Charakterisierung der Adenylatkinasen durchgeführt.

7.2 Charakterisierung der Adenylatkinasen

7.2.1 Aussagen zur Reinheit der hergestellten Präparate

Die Reinheit der Präparate wurde mit Hilfe der Disk - Gelelektrophorese (II, 4.5) und durch isoelektrische Fokussierung (II, 4.7) überprüft.

Wie die Versuchsauswertungen ergaben, lag keine der angereicherten Adenylatkinasen als homogenes Präparat vor.
Dabei schwankte die Zahl der sichtbaren Proteinbanden in den Präparaten zwischen 2 (T.denitrificans)und 5 (C.warmingii).
Die Adenylatkinasen waren jedoch frei von Störenzymen, die die Aufnahme kinetischer Daten hätten beeinträchtigen können.

7.2.2 Bestimmung des pH - Optimums

Wie Vorversuche ergeben hatten, wurden die größten spezifischen Aktivitäten unter Verwendung eines 75 mM Tris - HCl Puffers erzielt.

Demzufolge wurde der Einfluß des pH - Wertes auf die Aktivität der entsprechenden Adenylatkinase mit einem Puffer dieser Molarität in Richtung der ADP - Bildung gemessen.

Alle untersuchten Adenylatkinasen zeigten in einem pH - Bereich zwischen 7.5 und 8.9 hohe spezifische Aktivitäten; die pH - Optima der Adenylatkinasen sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: pH - Optima der untersuchten Adenylatkinasen

Organismus	pH - Optimum bei
Chromatium gracile	8.3
Chromatium minutissimum	8.5
Chromatium vinosum	8.2
Chromatium warmingii	8.0
Thiobacillus denitrificans	8.2

7.2.3 Ionale Bedürfnisse der Adenylatkinasen

Die Adenylatkinasen benötigen für ihre katalytischen Funktionen (zweiwertige) Ionen (Noda, 1973).

Vor Aufnahme der Substratsättigungskurven sollte geklärt werden, mit welchen Metallionen die Adenylatkinasen ihre größten Aktivitäten erreichen.

Die zur Klärung der Fragestellung notwendigen Testansätze enthielten in einem Volumen von 1 ml die folgenden Substanzen:

1 mM ATP, 1 mM AMP, 75 mM Tris - HCL Puffer (pH 8.0) und variierende Mengen (0.25, 0.5, 1 und 5 mM) des zu testenden Kations.
Die Ansätze wurden bei 25°C in einem temperierten Wasserbad für 5 min inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe des gereinigten Enzymextraktes gestartet und nach 5 min durch Kochen terminiert wurde.
Über die Methode der Endpunktbestimmung (II, 2.2) wurde die spezifische Aktivität des Ansatzes ermittelt.
Die folgende Tabelle faßt die Ergebnisse zusammen, die bei der Untersuchung der Adenylatkinase aus C.gracile erhalten wurden.

Wie aus der Tabelle eindeutig hervorgeht, wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten mit dem zweiwertigen Magnesiumkation in einer Konzentration von 1 mM erhalten.

In der Reihenfolge der Effektivität der getesteten divalenten Kationen gibt es unter den getesteten Organismen einige Unterschiede (C.minutissimum: $Mg^{2+} > Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mn^{2+}$; C.vinosum:

$Mg^{2+} > Ca^{2+} > Mn^{2+} > Ba^{2+}$), doch allen ist gemeinsam, daß die höchste Aktivität mit Mg^{2+}-Ionen erhalten wird.

Tabelle 16: Der Einfluß verschiedener zweiwertiger Kationen auf die Aktivität der Adenylatkinase aus C.gracile

	Konzentration des Kations im Ansatz			
Kation	0.25 mM	0.5 mM	1 mM	5 mM
Ca^{2+}	19 E	22.4 E	25.1 E	21 E
Mg^{2+}	23 E	23.5 E	25.1 E	25.5 E
Mn^{2+}	22.3 E	23.1 E	24.1 E	17 E
Ni^{2+}	3.7 E	3.1 E	4.2 E	3 E
Ba^{2+}	19.5 E	22.8 E	24.5 E	23.3 E
Zn^{2+}	2.8 E	5.2 E	4.8 E	2.3 E
Fe^{2+}	6.3 E	6.3 E	5.1 E	3.8 E
Cu^{2+}	5.4 E	7.2 E	8.1 E	2.8 E

Um eine Verfälschung der Testergebnisse auszuschließen, wurden nur die Chloride der entsprechenden Verbindungen verwendet. Die Ergebnisse in der Tabelle geben einen Durchschnittswert aus jeweils 5 durchgeführten Parallelmessungen an.

7.2.4 Temperatureinfluß

Die aus den Organismen isolierten und angereicherten Adenylatkinasen konnten ohne großen Aktivitätsverlust über einen längeren Zeitraum bei $-18^{\circ}C$ gelagert werden.
Selbst bei einer Lagerungstemperatur von $4^{\circ}C$ kam es innerhalb von 24h nur zu einer geringfügigen Aktivitätsminderung (>15%).

Die Adenylatkinasen zeigten auch gegenüber hohen Temperaturen ein sehr ähnliches Verhalten.
Alle isolierten Enzyme erreichten ihre maximale Umsatzrate bei einer Testtemperatur von $40^{\circ}C$.
Nur die aus C.minutissimum angereicherte Adenylatkinase zeigte bei

35°C ihre Maximalaktivität.

Eine fünfzehnminütige Inkubationszeit bei Temperaturen zwischen 44°C und 47°C führte bei fast allen Organismen zu einer Aktivitätsminderung um 50%.
Lediglich das aus C.vinosum isolierte Enzym zeigte eine größere Hitzestabilität.
Einen zusammenfassenden Überblick über die Ergebnisse vermittelt Tabelle 17.

Tabelle 17: Aussagen zur Temperaturverträglichkeit

Organismus	Optimale Reaktionstemperatur	Inaktivierung zu 50% bei
Chromatium vinosum	40°C	58°C/15 min
Chromatium warmingii	40°C	47°C/15 min
Chromatium gracile	40°C	47°C/15 min
Thiobacillus denitrificans	40°C	48°C/15 min
Chromatium minutissimum	35°C	44°C/15 min

7.2.5 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde, wie unter (II, 4.4.1) beschrieben, durch Gelfiltration an einer Sephadex S 200 - Säule bestimmt.
Die Eichung des Säulenmaterials und die Elution der Adenylatkinasen erfolgten in einem 75 mM Tris - HCl Puffer vom pH 8.0, der zusätzlich 1 mM $MgCl_2$ enthielt.
Die aufgrund der Elutionsvolumina der Adenylatkinasen erfaßten Molekulargewichte sind in Tabelle 18 zusammengefaßt.

Tabelle 18: Molekulargewichte der untersuchten Adenylatkinasen

Organismus	Molekulargewicht
Chromatium gracile	45 000 ± 2 000
Chromatium minutissimum	45 700
Chromatium vinosum	51 000
Chromatium warmingii	37 000 ± 4 000
Thiobacillus denitrificans	34 000

7.2.6 Substratsättigungskurven

Es wurden lediglich die K_m - Werte für das Substrat ADP bestimmt, da dieses Endprodukt der ADP - Sulfurylasereaktion im letzten Schritt der postulierten Reaktionsfolge APS - Reduktase ⟶ ADP - Sulfurylase ⟶ Adenylatkinase in biologisch verwertbares ATP umgesetzt werden muß und die Affinität der Adenylatkinase zu ihrem Substrat ADP weitere Rückschlüsse auf die Effektivität der Umwandlung des äktivierten Sulfats (Aminuddin, 1981) über den oben aufgezeigten Weg zuläßt.

Die Tests wurden bei 25°C in 1 ml Standartansätzen (II, 3.2.3) durchgeführt.
Die Reaktion wurde durch Zugabe des Extraktes gestartet und nach 5 min durch Abkochen beendet.
Mit dem proteinfreien Überstand der Extraktlösung wurde die Menge an gebildetem ATP nach (II, 2.3) bestimmt.

Wie Testauswertungen ergaben, gehorchte die Adenylatkinase der Michaelis - Menten - Kinetik, was sich am hyperbolischen Verlauf der Sättigungskurven zeigte.

Alle untersuchten Adenylatkinasen der Chromatiaceae zeigten die gleich hohe Affinität zu ihrem Substrat ADP (Tabelle 19). Lediglich die aus T.denitrificans angereicherte Adenylatkinase weist eine etwas geringere Substrataffinität auf.

Tabelle 19: Angaben zur Halbsättigungskonstante für ADP

Organismus	K_m - Wert (mM)
Chromatium minutissimum	0.166 0.063+
Chromatium gracile	0.091
Chromatium vinosum	0.085
Chromatium warmingii	0.151
Thiobacillus denitrificans	0.454

+ Die Bestimmung des K_m - Wertes erfolgte unter optimalen Reaktionsbedingungen (pH = 8.5; Reaktionstemperatur 35°C).

8 Pyrophosphatasen

Während Pyrophosphat das Substrat der von der Pyrophosphatase katalysierten stark exergonischen Spaltungsreaktion ist, benötigt die ATP - Sulfurylase PP_i, um über einen nukleophilen Gruppenaustausch das aktivierte Sulfat in ATP überführen zu können.
Beide Enzyme haben somit um das gemeinsame Substrat zu konkurrieren.
Die vorgenommenen Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, ob der ATP - Sulfurylase nicht von vornherein (wegen einer möglichen höheren Substrataffinität der Pyrophosphatase) die Chance genommen wird, der ADP - Sulfurylase das Reaktionsprodukt der APS - Reduktase (APS) streitig zu machen.

8.1 Wachstumsphysiologische Untersuchungen

Die Aktivitäten der ATP - Sulfurylase aus T.denitrificans RT und C.warmingii stehen in Relationen zu den jeweiligen Wachstumsphasen (III, 2.1; III, 2.2).
Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den Pyrophosphatasen der oben

angesprochenen Organismen um konstitutive Enzyme handelt und ob ihre Aktivitäten ebenfalls in Korrelation zu den Wachstumsphasen stehen, wurden die Aktivitäten unter dem Aspekt der Wachstumsabhängigkeit (s. III, 2.1 und 2.2) untersucht und die spezifischen Aktivitäten der Pyrophosphatasen nach Taussky und Shorr (II, 3.2.4) colorimetrisch bestimmt.

Die Versuchsergebnissen können den Abbildungen 26 und 27 entnommen werden.

Wie aus ihnen hervorgeht, zeigen die Pyrophosphatasen aus C.warmingii und T.denitrificans RT zu unterschiedlichen Zeiten des Wachstums verschieden hohe Aktivitäten.
Obgleich ein solches Versuchsergebnis nicht unbedingt zu erwarten gewesen ist, kann folgende Erklärung für die Wachstumsabhängigkeit der Pyrophosphataseaktivität gegeben werden:

Die Hauptaufgabe der Pyrophosphatase besteht darin, das bei zahlreichen Synthesprozessen anfallende anorganische Pyrophosphat aus dem entsprechenden Reaktionsgleichgewicht der Synthesereaktionen zu entfernen, um den Ablauf der meist endergonischen Reaktionen überhaupt erst zu ermöglichen.

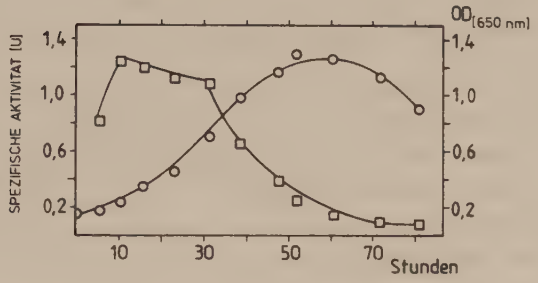
Einen Beweis für die u.a. von Kornberg (1962) aufgestellte Hypothese liefert der streng mit der Proteinbiosynthese verknüpfte Anstieg der Pyrophosphataseaktivität während des Zellwachstums.

Ist das Wachstum weitgehend abgeschlossen und kommt die Proteinbiosynthese langsam zum Stillstand, sinkt der Pyrophosphatasetiter merklich ab.

Während die Aktivitäten von Pyrophosphatase und ATP - Sulfurylase bei T.denitrificans etwa in der gleichen Größenordnung liegen, ist die spezifische Aktivität der Pyrophosphatase aus C.warmingii um ein vielfaches höher als die der ATP - Sulfurylase desselben Organismus.

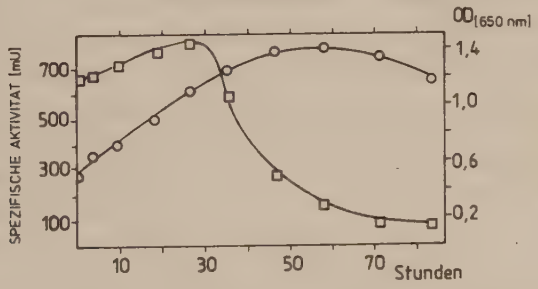
In T.denitrificans und C.warmingii zeigen die um das Pyrophosphat konkurrierenden Enzyme beinahe zur gleichen Zeit ihre maximale Aktivität, und etwa zur gleichen Zeit kommt es (bei Verminderung der Biosyntheseleistung der Zelle) zu einer kontinuierlichen Abnahme

Abbildung 26: Spezifische Aktivitäten der Pyrophosphatase während des chemolithoautotrophen Wachstums von T.denitrificans auf Thiosulfat



Legende: O—O Trübungsmessung (650 nm) □—□ Spezifische Aktivität der PPase

Abbildung 27: Spezifische Aktivität der Pyrophosphatase während des photolithoautotrophen Wachstums von C.warmingii auf Sulfid



Legende: O—O Trübungsmessung □—□ Spezifische Aktivität der PPase

ihrer spezifischen Aktivitäten.

Weiteres Ziel der Untersuchungen mußte es sein, die Pyrophosphatasen aus T.denitrificans und C.warmingii zu isolieren und zu rei-

nigen, um ihre Affinitäten zum Pyrophosphat mit denen der ATP - Sulfurylase vergleichen zu können.

8.2 Anreicherung der Pyrophosphatasen

8.2.1 Herstellung des zellfreien Extraktes

Die Herstellung des zellfreien Extraktes erfolgte nach der unter (II, 3.1) im Methodenteil beschriebenen Weise.
Die Aktivitäten der Pyrophosphatasen von C.warmingii und T.denitrificans konnten zu über 90% nach erfolgtem Aufschluß im löslichen Überstand der Ultrazentrifugation nachgewiesen werden.
Der partikelfreie Überstand wurde zur weiteren Anreicherung verwendet.

8.2.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Pyrophosphatasen konnten, wie bereits unter (III, 4.1.2) beschrieben, bei beiden Organismen durch eine einzige Passage über einen Anionenaustauscher (Whatman DE 52) von den ATP - Sulfurylasen abgetrennt werden.
Nach erfolgter Säulenchromatographie (Bedingungen s. III, 4.1.2) wurden die Fraktionen mit einem hohen Gehalt an Pyrophosphataseaktivität vereinigt und zum Entsalzen über eine Sephadex G 25 - Säule gegeben, die ein Gelbettvolumen von ca. 50 ml hatte.

8.2.3 Ammoniumsulfatfraktionierung

Das entsalzte Gelfiltrat wurde bei beiden Organismen in 4 Schritten durch Ammoniumsulfatfällung bei $0^{o}C$ fraktioniert und die Sedimente der Fraktionen 0 - 25%, 26 - 40% und 41 - 60% verworfen.

Die Sedimente der Fällungen zwischen 61 - 80% Sättigung wurden in einer geringen Menge eines 100 mM Tris - HCl Puffers (pH 8) resuspendiert; sie enthielten die Pyrophosphatasen in hohen spezifischen Aktivitäten.

8.2.4 Gelfiltration

Die $(NH_4)_2SO_4$ - Fraktionen mit Gehalt an PPase wurden auf eine Se-

phadex G 200 - Säule (1.2 x 85 cm) aufgetragen und mit Hilfe eines 100 mM Tris - HCl Puffers (pH 8.0) eluiert.
Die Identifizierung der Fraktionen mit Pyrophosphatasegehalt erfolgte wiederum mit der unter (II, 3.2.4) beschriebenen Methode.

Das aktive Eluat war frei von hemmenden Aktivitäten anderer Enzyme. Die gereinigten Pyrophosphatasen verfügten in den Spitzenfraktionen über eine spezifische Aktivität von 40.88 E (T.denitrificans) bzw. von 7.56 E bei C.warmingii.
Auf eine weitere Anreicherung wurde verzichtet.

Tabelle 20 gibt einen Überblick über die verwendeten Anreicherungsmethoden der Pyrophosphatase aus T.denitrificans und ihrer Effektivität.

8.3 Untersuchungen am gereinigten Enzymextrakt

8.3.1 Zeitliche Linearität des Substratumsatzes

Für die gereinigten Pyrophosphatasen konnten im getesteten Proteinbereich (1 - 10 µg/Ansatz) in einem Testzeitraum von 10 min eine Linearität für den Pyrophosphatumsatz festgestellt werden.

In den folgenden Untersuchungen wurden die spezifischen Aktvitäten eines Ansatzes nach 2, 5 und 10 min in Parallelproben bestimmt. Die zugesetzte Enzymmenge betrug jeweils 10 µl, was einer ungefähren Proteinkonzentration von 4 - 6 µg entsprach.

8.3.2 pH - Optima

Zur Einstellung des pH - Wertes wurde ein 50 mM Tris - HCl Puffer verwendet.
Die Tests wurden bei 25°C in einem temperierten Wasserbad durchgeführt, wobei die Ansätze (1 ml Gesamtvolumen) äquimolare Mengen (1 mM) an Magnesiumionen und anorganischem PP_i enthielten.

Beide Enzyme verfügten in einem Bereich zwischen pH 7.5 und 9.0 über ein breites pH - Optimum.
Maximale Aktivität wurde bei T.denitrificans unter den aufgeführten Versuchsbedingungen bei pH 8.5, bei C.warmingii bei pH 8.4 ermittelt.

Tabelle 20: Anreicherung der Pyrophosphatase aus Thiobacillus denitrificans

Fraktion	Volumen (ml)	Gesamt-protein (mg)	Protein (mg/ml)	Aktivität (U/ml)	Gesamt-aktivität (units)	Spez. Aktivität (U/mg Pr.)	Anreicherungs-faktor	Ausbeute
S_{144}	28	710	25.35	41.07	1150	1.62	1	100
Ionenaustauscher DE 52	9.6	4.65	0.484	4.15	39.9	8.58	5.29	3.46
$(NH_4)_2SO_4$ Fraktion 60-80 %	1.5	0.755	0.503	20.7	31.05	41.13	25.39	2.7
Gelfiltration	3.2	0.233	0.0145	4.67	14.95	64.15	39.6	1.3

8.3.3 Ionale Bedürfnisse

Ohne den Zusatz eines zweiwertigen Kations zeigten die Pyrophosphatasen aus C.warmingii und T.denitrificans keinerlei Aktivität.

Für die aus T.denitrificans angereicherte Pyrophosphatase wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten in Gegenwart von Mg^{2+}-Ionen registriert.
Die in gleich hohen Konzentrationen ebenfalls als Chloride zugesetzten Metalle Mangan, Cobalt und Zink führten im Pyrophosphataseansatz nicht zu ähnlich hohen Aktivitäten wie beim Einsatz von Magnesium.
Mit Barium, Eisen, Kupfer und Kalzium konnten keine Aktivitäten gemessen werden.

Für das Enzym aus C.warmingii ergab sich hinsichtlich der Effizienz der eingesetzten Kationen eine andere Reihenfolge.
So wurden beim Einsatz von Manganionen höhere Umsätze

Tabelle 21: Einfluß von Metallkationen auf die Pyrophosphatasen

Kation	Aktivität in Prozent	
	Chromatium warmingii	Thiobacillus denitrificans
Mg^{2+}	100	100
Cd^{2+}	27.3	0
Mn^{2+}	155	9
Zn^{2+}	50	19
Ca^{2+}	29.1	0
Co^{2+}	0	5
Sn^{2+}	50	11
Ni^{2+}	14	0
Cu^{2+}	21.6	0
Ba^{2+}	n.d.	0
(-)	0	0

Im Testansatz befanden sich jeweils 1 mM des entsprechenden Metallchlorides, so daß ein Verhältnis von 1:1 zwischen dem Kation und dem Substrat Pyrophosphat herrschte.

Einer Aktivität von 100% entspricht bei T.denitrificans einer spe-

fischen Aktivität von 27 Einheiten, während sie bei C.warmingii einer von 15.2 Einheiten entspricht.

als mit Magnesiumionen erzielt. Mit anderen Ionen (Cd^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}) wurden geringere oder keine (Co^{2+}, Sn^{2+}, Ba^{2+}) Aktivitäten gemessen.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 zusammengefaßt.

Wie weitere Untersuchungen ergaben, wurden für Thiobacillus denitrificans die größten Aktivitäten erzielt, wenn die Konzentration von Mg^{2+} - Ionen und von PP_i in einem Verhältnis von 1:1 zueinander standen. Für C.warmingii nahm dieses Verhältnis einen Wert >1 an.

8.3.4 Substratspezifität

Zahlreiche Phosphatester wurden den gereinigten Pyrophosphatasen als mögliche Substrate in variierenden Konzentrationen (0.1 - 5 mM) angeboten.
Die Enzyme vermochten jedoch weder die Adenylate (AMP, ADP, ATP) noch phosphorylierte Zucker (Glukose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Glukose-1,6-bisphosphat) oder Thiaminpyrophosphat zu hydrolysieren.

8.3.5 Stabilität der Pyrophosphatasen

Im Hitzeinkubationstest erwiesen sich die untersuchten Pyrophosphatasen als äußerst temperaturstabil.

So zeigte die Pyrophosphatase aus T.denitrificans nach einer fünfzehnminütigen Inkubationsperiode bei 65°C noch volle katalytische Aktivität; das aus C.warmingii isolierte Enzym verfügte unter den gleichen Bedingungen über 88% seiner Ausgangsaktivität.

Beide Enzyme konnten jedoch nicht über eine längere Periode bei -18°C gelagert werden, ohne daß ein Großteil ihrer Aktivitäten dabei verloren ging.

8.3.6 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichte der nativen Proteine wurden durch Gelfiltration an einer Sephadex G 200 - Säule ermittelt.
Wie aus dem Vergleich ihrer spezifischen Elutionsvolumina mit denen der Eichproteine hervorging, beträgt das Molekulargewicht der Pyrophosphatase aus Thiobacillus denitrificans 81 000, während für das aus Chromatium warmingii angereicherte Enzym ein Molekulargewicht von ca. 117 000 festgestellt wurde.

8.3.7 Kinetische Daten der angereicherten Pyrophosphatasen

Die Aufnahmen der Substratsättigungskurven für PP_i zeigten für beide Organismen einen hyperbolischen Verlauf, wenn das Verhältnis von $MgCl_2/PP_i$ einen Wert ≥ 1 annahm.

Die Messungen wurden bei 25°C in einem temperierten Wasserbad vorgenommen. Die Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 1 ml neben variierenden Mengen von $MgCl_2/PP_i$ (in einem jeweils konstanten Verhältnis) 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 9) und das gereinigte Enzym (8 µg Protein bei T.denitrificans; 5.6 µg bei C.warmingii).

Zu definierten Zeiten (0, 1, 3 und 5 min) nach Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.1 ml einer 20%igen TCA - Lösung terminiert und das freigesetzte Phosphat nach Taussky und Shorr (1953) bestimmt.

Bei der Interpretation der erhaltenen Daten muß jedoch berücksichtigt werden, daß in einer wässrigen Lösung neben dem eigentlichen Substrat $MgPP_i^{2-}$ eine Fülle von molekularen und ionalen Verbindungen (Mg^{2+}, $MgHPP_i^{1-}$, MgH_2PP_i, Mg_2PP_i, PP_i^{4-}, HPP_i^{3-}, $H_2PP_i^{2-}$, $H_3PP_i^{1-}$ und H_4PP_i) vorhanden sind und in einem komplexen, nichtlinearen Verhältnis zueinander stehen.
Sie alle vermögen als potentielle Effektoren einen hemmenden oder aktivierenden Einfluß auf den Substratumsatz zu nehmen.
Um den Einfluß der Effektoren so gering wie wie möglich zu halten, wurden die Reaktionskinetiken bei einem pH von 9 aufgenommen, da in einem solch basischen Bereich die Konzentration an protonierten Verbindungen vernachlässigbar gering ist.

Vernachlässigt man den möglichen Einfluß von PP_i und Mg_2PP_i und

nimmt bei der Ermittlung der PP_i-Kinetiken $MgPP_i^{2-}$ als einziges aktives Substrat an, ergeben sich für die Pyrophosphatasen aus I. denitrificans und C.warmingii K_m-Werte von 0.147 mM und 0.205 mM.

9 Aussagen zum Energiegewinn durch Substratphosphorylierung

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, daß Chromatium warmingii und Thiobacillus denitrificans neben der ADP - Sulfurylase mit der ATP - Sulfurylase unter lithotrophen Wachstumsbedingungen über ein weiteres Enzym verfügen, daß die in der Sulfatesterbindung des APS enthaltene Energie in die für den Organismus verwertbare Energieform ATP umzuwandeln vermag.

Das folgende Experiment sollte Aufschluß darüber geben, in welchem Umfang beide Sulfurylasen unter physiologischen Bedingungen an der biochemischen Umwandlung des APS beteiligt sind.

Die Tests wurden mit den aus T.denitrificans angereicherten Sulfurylasen durchgeführt.
Um den physiologischen Zuständen, die in der Zelle während des Wachstums herrschen, Rechnung zu tragen, wurden in einer Reihe von Parallelansätzen jeweils die Konzentrationen von APS, PP_i und P_i in den einzelnen Testansätzen variiert.
Auf diese Weise sollten die unterschiedlichen Konditionen simuliert werden, unter denen ADP - Sulfurylase und ATP - Sulfurylase um ihr gemeinsames Substrat APS konkurrieren müssen.

Die Reaktionsansätze wurden bei 30°C (entsprechend der Anzuchtstemperatur des Organismus) in einem Wasserbad vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe äquimolarer Enzymmengen von ADP - und ATP - Sulfurylase gestartet wurden.
Die Reaktionen wurden nach 5 min durch Einbringen der Probe in ein kochendes Wasserbad terminiert.

Bei der Festlegung der Testparameter wurde von der Annahme ausge-

gangen, daß während der ersten Hälfte der exponentiellen Wachstumsphase (Experiment 1, Tabelle 22) hohe Konzentrationen von APS, PP_i und P_i produziert bzw. freigesetzt werden.
Während dieser Periode ist die APS - Reduktase äußerst aktiv; zugleich läuft die Proteinbiosynthese mit maximaler Geschwindigkeit ab, wobei als Nebenprodukt der dabei ablaufenden biochemischen Prozesse in großem Umfange AMP und PP_i freigesetzt werden.

Mit fortschreitendem Wachstum und Alter der Kulturen nimmt die Proteinbiosyntheserate ab, so daß folglich weniger PP_i freigesetzt wird. Parallel dazu gehen auch die Umsätze des Schwefelstoffwechsels und damit die Aktivitäten der APS - Reduktase zurück. Dieser Überlegung wurde mit dem 2. Experiment Rechnung getragen.

Die Menge an freigesetztem Pyrophosphat verringert sich kontinuierlich, bis sich der Organismus schließlich in der stationären Wachstumsphase befindet.
Gleichzeitig erhöht sich die Phosphatkonzentration im Cytoplasma, die Oxidation der Schwefelverbindungen läuft in vermindertem Umfang weiter ab (Experiment Nr.3).

Die Auswertungen der Experimente sind in Tabelle 22 zusammengefaßt.

Tabelle 22: Vergleichende Messungen zum APS - Umsatz durch ADP - Sulfurylase und ATP - Sulfurylase

Experiment Nr.1	Konzentration an APS	PP_i	P_i	Anteil des APS - Umsatzes über die ATP - Sulfurylase
1	1 mM	0.2 mM	0.5 mM	78.15%
2	0.7 mM	0.1 mM	2.5 mM	63.34%
3	0.1 mM	0.02 mM	10 mM	37.6 %

Nach Abstoppen der Reaktion durch Kochen wurden dem Reaktionsansatz Aliquots zur Analyse des restlichen, nicht umgesetzten APS und zur Bestimmung des durch die ATP - Sulfurylase gebildeten ATP entnommen.

Die Menge des verbrauchten APS wurde zu 100% gesetzt.
Da das APS nur durch die beiden Sulfurylasen hatte umgewandelt werden können, mußte der Anteil an gebildetem ATP der Menge an APS entsprechen, die über die ATP - Sulfurylase umgesetzt worden war. Die angegebenen prozentualen Werte für die ATP - Sulfurylase nehmen bezug auf diese Tatsache.
Die in der Tabelle wiedergegebenen Daten stellen den Mittelwert aus 7 durchgeführten Meßreihen dar.

Beide Enzyme partizipieren simultan am Umsatz des APS und wirken an der Substratphosphorylierung mit.
Ihr individueller Beitrag zur Konversion des aktivierten Sulfats in das entsprechende Adenylat hängt, wie aus den Versuchen 1 - 3 hervorgeht, hauptsächlich von den Konzentrationen der benötigten Substrate ab.

In welchem Umfang ADP - Sulfurylase und ATP - Sulfurylase am Umsatz des aktivierten Sulfats beteiligt sind und welchem Enzym dabei die Schlüsselrolle auf dem Weg der Substratphosphorylierung zukommt, wird weitestgehend durch die Syntheseleistungen der Zelle bestimmt.

10 Die Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase als weiteres sulfitoxidierendes Enzym

Sulfitoxidasen sind in der Natur weit verbreitet.

In Pflanzen wurde das Enzym in den Internodien von Erbsen (Arrigoni, 1959), im Hafer (Tager et al. , 1955) und in Weizenwurzeln nachgewiesen (Fromageot et al. , 1960).
In tierischen Organismen terminiert die Sulfitoxidase durch die Oxidation des Sulfits zum Sulfat den Weg der Spaltung schwefelhaltiger Aminosäuren.
Das Enzym ist dort im Intermediärraum der Mitochondrien lokalisert, enthält einen Hämanteil und Molybdän und überträgt die Elektronen aus der Sulfitoxidation auf ein Cytochrom c, welches auf der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist (Johnson und Rajagopalan, 1980).
Bei der Sulfitoxidase der tierischen Mitochondrien handelt es sich, wie die spektralen Auswertungen verschiedener gereinigter Enzyme ergeben haben, um ein Cytochrom vom b_5-Typ (Kessler und Rajagopalan, 1972; McLeod et al. , 1961; Johnson, 1981).

Den Untersuchungen von Kessler und Rajagopalan zufolge (1972) soll es sich auch bei der Sulfitoxidase aus T.thioparus um ein Cytochrom handeln. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu den Aussagen von Lyric und Suzuki (1970a), die den im Spektrum nachweisbaren Cytochromanteil als Kontamination der Sulfitoxidase ansahen.

Toghrol und Southerland (1983) wiesen für T.novellus eine Sulfitoxidase nach, deren Absorptionsspektrum dem der Sulfitoxidase aus Rattenleber (McLeod et al. , 1961) ähnelte.
Das bakterielle Enzym enthielt ebenso einen Hämanteil (Cytochrom b_5-Typ) wie auch Molybdän. Als Elektronenakzeptor der Sulfitoxidase fungierte dabei natives Cytochrom, was bereits von Charles und Suzuki (1966) erfolgreich eingesetzt worden war.
Auch T.intermedius verwendet natives Cytochrom als Elektronenakzeptor der Sulfitoxidase (Charles, 1969), wohingegen das Enzym aus T. neapolitanus weder endogenes Cytochrom c noch solches aus Pferdeherz zu reduzieren vermochte (Hempfling und Trudinger, 1967).

Brückenhaus gelang 1977 die partielle Reinigung der Sulfitoxidase aus

C.vinosum. Das Spektrum dieses Enzyms deutete auf einen Cytochrom c' - Anteil hin.
Für das Enzym aus C.minutissimum (Ulbricht, 1981) war ein solcher Cytochromanteil nicht festgestellt worden.
Beide Autoren berichten, daß Cytochrom c als Elektronenakzeptor nicht eingesetzt werden konnte.

In den folgenden Versuchen sollte geklärt werde, ob es sich bei den 'Sulfitoxidasen' der Chromatiaceae um Cytochrome handelt bzw. ob sie über eine Cytochromkomponente verfügen und inwieweit sie die aus der Sulfitoxidation stammenden Elektronen auf (andere) Cytochrome zu übertragen vermögen.

Durch ergänzende enzymphysiologische Untersuchungen sollten Unterschiede zur APS - Reduktase aufgezeigt werden.

10.1 Haben die aus C.gracile gereinigten Cytochrome Sulfitoxidaseeigenschaften?

Da das von Brückenhaus (1977) isolierte Enzym Cytochrom c' zu enthalten schien, wurde während der Reinigung des entsprechenden Cytochroms aus C.gracile versucht, eine Korrelation zwischen Cytochromgehalt und der Aktivität der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase herzustellen.

Während nach der Ionenaustauschchromatographie (III, 2.5.1) in Cytochrom c'-haltigen Fraktionen noch enzymatische Aktivität einer 'Sulfitoxidase' nachgewiesen wurde, konnte durch die Ammoniumsulfatfällung eine Trennung zwischen Cytochrom c' und dem Enzym herbeigeführt werden.
Das sulfitoxidierende Enzym sedimentierte bereits bei einer Sättigungskonzentration zwischen 45 - 70% Ammoniumsulfat, das Cytochrom hingegen präzipitierte in einem Bereich zwischen 85 - 100% Salzsättigung.

Auch das Flavocytochrom und das Cytochrom c_{553} wurden auf ihre Eigenschaften als Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase hin untersucht.

Doch weder im Ferricyanid- noch im Cytochrom c - gekoppelten Test konnte eine 'Sulfitoxidaseaktivität' der isolierten Cytochrome beobachtet werden.

Alle Untersuchungen wurden unter Variation des pH - Wertes (pH 6.0 - 9.6) mit 50 mM Tris HCl/Tris-Maleat Puffer bei einer Reaktionstemperatur von 30°C durchgeführt.

10.2 Anreicherung der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktasen aus Chromatium gracile und Chromatium vinosum

Eine Anzahl von Sulfitoxidasen, die aus Thiobacilli isoliert und beschrieben wurden, vermögen analog zu den tierischen Sulfitoxidasen, ihre Elektronen auf Cytochrome zu übertragen.
Neben nativen Cytochromen (Charles und Suzuki, 1966; Charles, 1969), Cytochrom c aus Candida crusei (Aminuddin und Nicholas, 1974) oder Pferdeherz (Petushkova und Ivanovskii, 1976) konnte auch Cytochrom c_{552} aus Pseudomonas stutzeri als Elektronenakzeptor eingesetzt werden (Kodama et al. , 1970).

Die mit Rohextrakten der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktasen durchgeführten Vorversuche konnten nicht klären, ob Cytochrome als Elektronenakzeptoren zu fungieren vermögen.
Die bei Einsatz der verschiedenen Cytochrome gezeigten Sulfitumsetzungen waren äußerst gering und von einer möglichen Autoxidation des Sulfits kaum zu unterscheiden.

Da die mit Cytochromen ermittelten spezifischen Aktivitäten der 'Sulfitoxidasen' oft weit unter denen liegen, die bei Verwendung anderer Elektronenakzeptoren erzielt werden (McLeod et al. , 1961; Aminuddin und Nicholas, 1974), mußten die AMP-unabhängigen sulfitoxidierenden Enzyme aus C.gracile und C.vinosum angereichert werden.

Beide Enzyme erwiesen sich als äußerst labil.
So verlor die Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase aus C.gracile während einer zwölfstündigen Lagerung bei -18°C nahezu die Hälfte der ursprünglichen spezifischen Aktivität.
Aufgrund der geringen Stabilität betrug die Ausbeute an gereinigtem Enzym in beiden Organismen nie mehr als 0.5%

Das im Vordergrund stehende Ziel bei der Untersuchung der 'Sulfitoxidasen' war jedoch die Beantwortung der Frage, ob native Cytochrome in Chromatiaceae als Elektronenakzeptoren des Enzyms zu dienen vermögen.

Unter diesem Gesichtspunkt wurde auf eine langwierige quantitative Reinigung zugunsten einer raschen Anreicherung verzichtet.

10.2.1 Anreicherung der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase aus Chromatium gracile

Die zur Anreicherung des Enzyms führenden Schritte waren bis zur durchgeführten Ammoniumsulfatfällung mit denen identisch, die unter (III, 2.5.1) für die Reinigung des Cytochrom c' desselben Organismus beschrieben wurden.
Vom Ionenaustauscher wurde das Enzym bei einer Salzkonzentration zwischen 250 - 300 mM NaCl abgetrennt.
Der eingeengte und entsalzte Extrakt präzipitierte bei einem Ammoniumsulfatgehalt zwischen 45 - 70% Sättigung.

Das Sediment wurde in einer geringen Menge eines 50 mM Tris-HCl Puffers (pH 8.6) resuspendiert und zur weiteren Reinigung auf eine Sephadex G 150 - Säule (2.5 x 45 cm) aufgetragen, die in dem oben angegebenen Puffer äquilibriert worden war.
In den Spitzenfraktionen des Säuleneluates wurde eine maximale Aktivität von 0.6 - 0.8 Einheiten registriert.

10.2.2 Anreicherung der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase aus Chromatium vinosum

Während das Enzym aus C.gracile durch Ionenaustauschchromatographie angereichert wurde, konnte die Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase aus C. vinosum nur noch in Spuren im Säuleneluat nachgewiesen werden. Veränderungen der Elutionsbedingungen führten zu keiner Resultatsverbesserung, so daß auf diese Anreicherungsmethode verzichtet werden mußte.
Die Anreicherung erfolgte durch Ammoniumsulfatfällung (das Enzym fiel in einem Sättigungsbereich zwischen 45 - 70%) und anschließender Gelfiltration (s.III, 9.2.1).
In den Spitzenfraktionen wurde eine spezifische Aktivität von 0.85 Einheiten ermittelt.

10.3 Cytochrome als Elektronenakzeptoren der angereicherten Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktasen

Die aus Chromatium gracile isolierten und hochgradig gereinigten Cytochrome wurden im photometrischen Testsystem (II, 3.2.7) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den gereinigten Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktasen als Elektronenakzeptor zu dienen.
Daneben wurden die käuflich zu erwerbenden Cytochrome aus Candida crusei und Pferdeherz auf ihre Eignung als Elektronenakzeptor getestet. Die Ergebnisse der Versuchsreihen sind in Tabelle 23 zusammengefaßt.

Tabelle 23: Cytochrome als mögliche Elektronenakzeptoren der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktasen aus C.gracile und C.vinosum

Verwendeter Elektronenakzeptor	Spez. Aktivität (in mE) bei C.vinosum	C.gracile
$K_3Fe(CN)_6$	780	640
Flavocytochrom aus C.gracile	-	-
Cytochrom c_{553} aus C.gracile	-	-
Cytochrom c' aus C.gracile	29	58
Cytochrom c aus Pferdeherz	-	-
Cytochrom c aus Candida crusei	54	44

Die Messungen wurden unter identischen Bedingungen bei 30°C unter Verwendung eines 50 mM Tris-HCl Puffers vom pH 8.6 in einem Zeiss Spektralphotometer PM 4 vorgenommen. Dabei lag die $K_3Fe(CN)_6$-Konzentration bei 0.5 mM, die Sulfitkonzentration bei 0.25 mM und die der Cytochrome bei 0.05 mM.

Die aus C.gracile angereicherte Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase ist demnach in der Lage, die aus der Oxidation des Sulfits stammenden Elektronen auf das native Cytochrom c' zu übertragen.
Dabei wurde mit Cytochrom c' nur ca. 9% der Aktivität gemessen, die mit dem künstlichen Elektronenakzeptor Kaliumhexacyanoferrat erzielt wurde.
Auch Cytochrom c aus Candida crusei vermag in geringem Umfang als

Elektronenakzeptor der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase zu fungieren, während bei Einsatz aller anderen Cytochrome keine enzymatische Sulfitoxidation erfolgte,

Die an Chromatium vinosum durchgeführten Akzeptoruntersuchungen führten zu ähnlichen Ergebnissen.
Auch hier konnten nur Cytochrom c aus Candida crusei und Cytochrom c' aus C.gracile als Elektronenakzeptoren der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase erfolgreich eingesetzt werden.

10.4 Charakterisierung der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase aus Chromatium vinosum

10.4.1 pH - Optimum

Das pH - Optimum der Reaktion wurde mit dem photometrischen Nachweissystem (II, 3.2.7) ermittelt.
In einer Reihe von Messungen wurde der pH - Wert des Ansatzes mit 0.1 M Tris - HCL Puffer verändert.
Das Enzym war im gesamten getesteten pH - Bereich zwischen 7.5 und 9.6 aktiv. Dabei richtete sich die Höhe der spezifischen Aktivität und die Lage des Maximums nach dem verwendeten Elektronenakzeptor.
Diente Cytochrom c aus Candida crusei als Elektronenakzeptor des angereicherten Enzyms, lag das pH - Optimum der Reaktion mit 9.2 eindeutig im basischen Bereich.
Erst bei einem pH oberhalb von 8.4 wurden mehr als 50% der möglichen Aktivität festgestellt.

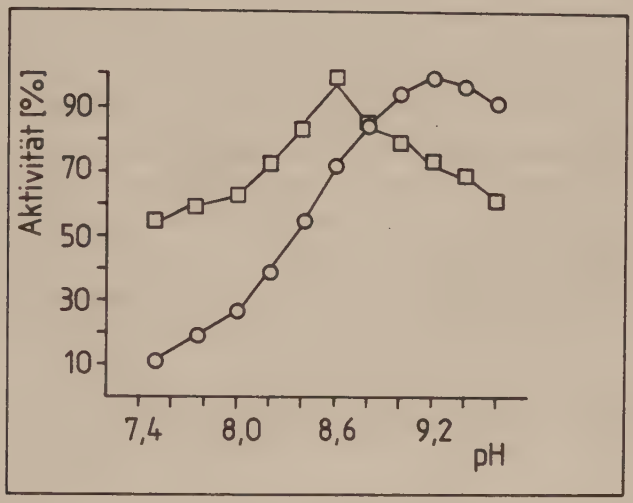
Im Ferricyanid-gekoppelten Test erwies sich das Enzym als weitestgehend stabil gegenüber kleineren pH - Schwankungen. Maximale Aktivität wurde bei einem pH von 8.6 erzielt.

Die Meßergebnisse sind auf der folgenden Seite in Abbildung 26 dargestellt.

10.4.2 Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht des Enzyms wurde durch Gelfiltration an Sephadex S 200 bestimmt.
Aus dem Vergleich der Elutionsvolumina der Eichproteine mit dem des Enzyms wurde auf ein Molekulargewicht von 68 000 geschlossen.

Abbildung 28: Einfluß des Elektronenakzeptors auf die Lage des pH-Optimums der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase aus Chromatium vinosum



Zeichenerklärung: □ Elektronenakzeptor Kaliumhexacyanoferrat
○ Elektronenakzeptor Cytochrom c aus Candida crusei

Diente $K_3Fe(CN)_6$ als Elektronenakzeptor, so entsprachen einer Aktivität von 100% 0.745 Einheiten, während im Cytochrom c - gekoppelten Test die höchste spezifische Aktivität 54 mE betrug.

10.4.3 Temperaturoptimum

Das Temperaturoptimum der Reaktion wurde im photometrischen Testsystem bei 420 nm (Ferricyanid als Elektronenakzeptor) oder 550 nm (im Cytochrom c gekoppelten Test) gemessen.
Die Ansätze wurden bei den entsprechenden Temperaturen vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe des partiell gereinigten Enzyms (20 µl) gestartet wurde.
Der Testansatz enthielt 0.1 M Tris-HCl Puffer (pH 8,6), 0.8 mM Sulfit, 0.25 mM $K_3Fe(CN)_6$ (oder 0.08 mM Cytochrom c aus Candida crusei) und H_2O dest ad 1 ml.

Unter diesen Bedingungen nahm die spezifische Aktivität des Enzyms bis zu einer Temperatur von 40°C kontinuierlich zu; oberhalb von 40°C trat eine rasche Inaktivierung ein.
Die Wahl des Elektronenakzeptors hatte keinen Einfluß auf das Testergebnis.

10.4.4 Einfluß der Temperatur auf die Stabilität

Wurde der gereinigte Extrakt bei Temperaturen um 4°C gelagert, verlor er innerhalb von 24 h ca. 90% seiner Aktivität; nach zwölfstündiger Inkubation bei -18°C konnten noch ca. 50% der Ausgangsaktivität nachgewiesen werden.
Eine 50%ige Aktivitätsabnahme wurde ebenfalls durch fünfzehnminütiges Einbringen des Extraktes in ein 45°C warmes Wasserbad herbeigeführt.
Eine vollständige Inaktivierung wurde in der gleichen Inkubationszeit bei 62°C registriert.

10.4.5 Substratsättigungskurven

Die Substratsättigungskurven der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase zeigen einen hyperbolischen Verlauf.
Die Aufnahme der Substratkinetiken erfolgte im Zeiss PM 4 bei 25°C unter Variation der jeweiligen Testparameter.
Dabei konnte für Cytochrom c das Auftreten einer Substratinhibierung bei Einsätzen oberhalb 0.1 mM beobachtet werden.
Wurde hingegen $K_3Fe(CN)_6$ als Elektronenakzeptor verwendet, trat keine Inhibierung auf.
Die aus den Lineweaver-Burk Diagrammen ermittelten K_m-Werte sind in der Tabelle 24 zusammengefaßt.

Tabelle 24: K_m-Werte für Sulfit, Ferricyanid und Cytochrom c

	Test mit	
	Cytochrom c	Ferricyanid
Sulfit	0.134	0.377 mM
Cytochrom c (*Candida crusei*)	0.037 mM	-
Kaliumhexacyanoferrat	-	0.491 mM

IV Diskussion

1 Möglichkeiten einer zusätzlichen Energiegewinnung durch Substratphosphorylierung

Enzymatisch physiologische Untersuchungen zum Energiegewinn durch Substratphosphorylierung bei Chromatiaceae führten zu einem sehr uneinheitlichen Bild.

Von den kleineren Chromatiaceae verfügten mit C.minutissimum und C.vinosum nur 2 der untersuchten 4 Vertreter über eine APS - Reduktase.

Während in C.purpuratum jeder Hinweis auf einen möglichen Energiegewinn durch Substratphosphorylierung fehlte, konnte in C.gracile mit der ADP - Sulfurylase ein APS-umwandelndes Enzym nachgewiesen werden.

Das großzellige Chromatium warmingii verfügte ebenso wie C.minutissimum und C.vinosum über eine fest an die Chromatophoren gebundene APS - Reduktase.
Die Bemühungen, das Enzym zu solubilisieren, führten nur bei C. vinosum zu einem partiellen Erfolg.

Mit der APS - Reduktase verfügen die oben genannten Organismen über die Möglichkeit, das bei der Schwefeloxidation anfallenden Sulfit in eine energiereiche Sulfatesterbindung zu überführen.

1.1 Die APS - Reduktasen aus Chromatiaceae

Die APS - Reduktasen aus C.warmingii, C.vinosum und C.minutissimum waren äußerst fest an die Chromatophoren gebunden.

Diese Befunde stehen in Einklang mit Berichten zur Lokalisation der APS - Reduktase in phototrophen Bakterien (Peck, 1966; Thiele, 1966 und 1968; Trüper und Peck, 1970; Kirchhoff und Trüper, 1974; Schwenn und Biere, 1979).

Lediglich Khanna und Nicholas (1983) beschreiben das Vorkommen einer im Cytosol lokalisierten APS - Reduktase in Chlorobium vibrioforme f. sp. thiosulphatophilum.

Trüper und Peck (1970) kamen zu der Schlußfolgerung, daß die APS - Reduktase in phototrophen Organismen chromatophorengebunden vorliegt und die Stärke der Bindung zwischen Enzym und Membran als stammspezifisch zu betrachten sei.

Wie aus den Untersuchungen von Peck et al. (1965), Bramlett und Peck (1975) und Stille und Trüper (1984) hervorgeht, liegen die APS - Reduktasen der Sulfatreduzierer ebensowenig membranassoziiert vor wie bei den Thiobacilli (Bowen et al. , 1966; Lyric und Suzuki, 1970b). Auch das Enzym aus T.denitrificans RT lag als lösliches Protein vor.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Solubilisierungsversuche mit Solvenzien verliefen ebenso negativ wie bei Schwenn und Biere (1979) oder Leyendecker (1983).

Die Auswertung wachstumsphysiologischer Untersuchungen ergaben für alle überprüften Chromatiaceae eine Korrelation zwischen den gewählten Anzuchtsbedingungen, dem Alter der Kulturen und den spezifischen Aktivitäten der APS - Reduktase.

So wurde die APS - Reduktase aus C.minutissimum bei Anzucht auf gut verwertbaren organischen Substraten wie Acetat oder Malat in Gegenwart der Schwefelquellen Sulfid oder Thiosulfat nicht ausgebildet. Unter mixotrophen Wachstumsbedingungen lagen die Aktivitäten des Enzyms eindeutig unter denen, die bei rein autotropher Anzucht auf Sulfid oder Thiosulfat erzielt wurden.

Einen ähnlichen Effekt beobachteten Thiele (1966) und Trüper und Peck (1970) bei heterotropher Anzucht von C.vinosum, während Petushkova und Ivanovskii (1976) an Thiocapsa roseopersicina keine Verminderung des aus der Substratphosphorylierung stammenden Energiegewinns beobachteten.

Eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der jeweiligen Wachstumsphase wurde auch von Schwenn und Biere (1979) und von Leyendecker (1983) beobachtet.

Nach den Untersuchungen von U.Fischer (persönliche Mitteilung) nimmt die Aktivität der APS - Reduktase in Thiocapsa roseopersicina erst nach vollständiger Umsetzung des Sulfids zu.
Über die aktivitätsmindernde Wirkung des Elektronendonators Sulfid

auf APS - Reduktase und ADP - Sulfurylase von C.minutissimum wurde bereits berichtet (Ulbricht, 1981).

Eine Korrelation zwischen spezifischer Aktivität und der jeweiligen Wachstumsphase besteht auch für Thiobacillus denitrificans.
Der Sulfatreduzierer Desulfobulbus propionicus hingegen verfügt über eine konstitutive APS - Reduktase (Stille und Trüper, 1984), die in ihrer spezifischen Aktivität keinerlei Beziehungen zur jeweiligen Wachstumsphase erkennen läßt.

Die APS - Reduktase aus C.vinosum konnte zu einem geringen Prozentsatz (ca. 8%) durch den Aufschluß solubilisiert werden.
Schwenn und Biere (1979) berichteten von ähnlichen Erfolgen; sie reicherten das Enzym jedoch nicht weiter an.

Die an die Chromatophoren gebundene APS - Reduktase erwies sich im Gegensatz zum gelösten Enzym als äußerst stabil.
Sie konnte ohne größere Aktivitätsverluste über mehrere Monate bei $-18^{o}C$ gelagert werden.
Im gereinigten Zustand verlor das Enzym bei Lagerung auf Eis innerhalb von 9 h ca. 50% seiner Ausgangsaktivität. Die Zugabe von Substanzen mit Sulfhydrylgruppen zum Enzymextrakt konnte die Inaktivierung im Gegensatz zu den aus D.desulfuricans (Peck et al., 1965) und Desulfobulbus propionicus (Stille und Trüper, 1984) isolierten APS - Reduktasen nicht verhindern.
Während die Enzyme aus T.thioparus (Lyric und Suzuki, 1970b) Thiocapsa roseopersicina (Trüper und Rogers, 1971) und T.denitrificans Bowen et al., 1966) Temperaturen von $60^{o}C$ unbeschadet überstehen und die APS - Reduktase aus D.desulfuricans (Peck et al. , 1965) über einen Hitzeschritt äußerst effektiv angereichert wurde, verfügt die APS - Reduktase aus C.vinosum nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei $45^{o}C$ nur noch über 50% ihrer Ausgangsaktivität. Sie ist damit ebenso temperaturempfindlich wie die Enzyme aus Desulfobulbus propionicus (Stille und Trüper, 1984) und C.warmingii (Leyendecker, 1983).

Als Elektronenakzeptoren der APS - Reduktase aus C.vinosum wurden hauptsächlich $K_3Fe(CN)_6$ und Cytochrom c aus Candida crusei verwendet.
Im Ferricyanid-gekoppelten Test lag das pH-Optimum der Reaktion

mit pH 8.2 in der gleichen Größenordnung wie bei anderen APS - Reduktasen.
Wurde Cytochrom c aus Candida crusei als Elektronenakzeptor verwendet, lag das pH-Optimum für die Reaktion bei 8.8 .
Die Verlagerung des pH-Optimums in den stärker basischen Bereich ist bisher bei allen untersuchten APS - Reduktasen nachgewiesen worden (Peck et al. , 1965; Lyric und Suzuki, 1970b; Trüper und Rogers, 1971; Bowen et al. , 1966; Michaels et al. , 1971; Bramlett und Peck, 1975; Stille und Trüper, 1984).

Auch das ermittelte Molekulargewicht der APS - Reduktase aus C. vinosum entsprach mit 185 000 den bis dato publizierten Werten 170 000 - 220 000), was als weiterer Beweis für eine prinzipielle und strukturelle Ähnlichkeit aller APS - Reduktasen unterschiedlicher Herkunft gewertet werden kann.

Eine Besonderheit hingegen weist das Spektrum der APS - Reduktase aus C.vinosum aus, das große Ähnlichkeit mit dem der APS - Reduktase aus Thiocapsa roseopersicina hat (Trüper und Rogers, 1971).

Außer diesem Enzym weist nur noch die von Tatzki (1979) isolierte APS - Reduktase aus Thiocystis violacea einen festen Cytochromanteil im Molekül auf.

Wie das von Trüper und Rogers (1971) beschriebene Enzym zeigt die APS - Reduktase aus C.vinosum im oxidierten Zustand Maxima bei 407 und 522 nm.
Nach Reduktion mit Dithionit entstehen Maxima bei 417, 522 und 552 nm (417, 520 und 550 nm bei Thiocapsa roseopersicina).

Alle bisher beschriebenen APS - Reduktasen verfügen über Flavingruppen, Nichthäm-Eisen und säurelabilen Schwefel.

Die Spektra von C.vinosum weisen im oxidierten und reduzierten Zustand im Bereich zwischen 440 und 500 nm starke Absorptionsdifferenzen auf, was nach Rao und Felton (1967) auf einen Flavinanteil hinweist.
Die Reinheitskontrollen mittels Gelelektrophorese und Elektrofokussierung wiesen auf das Vorkommen von Fremdproteinen im Enzympräparat hin.
Da die APS - Reduktase aus C.vinosum wegen ihrer geringen Solubi-

lität und ihrer Labilität im gelösten Zustand nicht weiter angereichert werden konnte, wurde auf eine Bestimmung der einzelnen Enzymkomponenten verzichtet.
Aus dem gleichen Grunde können keine definitiven Aussagen über die Zugehörigkeit des Cytochromanteils zum Enzym gemacht werden.
Auffällig ist jedoch, daß bisher in C.vinosum lediglich ein Cytochrom c_{551} (Tomiyama et al. , 1983) und ein Cytochrom c_{553} (Cusanovich und Bartsch, 1969) nachgewiesen wurde.
Auch aus C.gracile konnte kein Cytochrom c_{552} isoliert werden, obwohl laut U.Fischer(pers. Mitteilung) beide Organismen über die gleichen Cytochrome verfügen sollen.

In Chromatium minutissimum und in Chromatium vinosum scheiterte der Versuch, Cytochrom c aus Pferdeherz als Elektronenakzeptor der APS - Reduktase einzusetzen.
Auch die APS - Reduktase aus Thiocapsa roseopersicina war nicht in der Lage, dieses Cytochrom zu reduzieren.
Eine solche Reduktion war in D.vulgaris, T.thioparus und Desulfobulbus propionicus beobachtet worden (Bramlett und Peck, 1975; Lyric und Suzuki, 1970b; Trüper und Stille 1984).

Bramlett und Peck (1975) ermittelten eine höhere Affinität zum Pferdeherzcytochrom als zum Cytochrom c aus Candida crusei, während Lyric und Suzuki (1970b) für T.thioparus den umgekehrten Effekt beobachteten.
In allen untersuchten Fällen war die Reduktionsrate des Sulfits mit Cytochrom c um ein vielfaches geringer als mit Kaliumhexacyanoferrat (1:80; Lyric und Suzuki, 1970b).

Die aus Chromatium gracile isolierten Cytochrome konnten nur bedingt als Elektronenakzeptoren der APS - Reduktase aus C.vinosum fungieren.
Die bei ihrem Einsatz ermittelten Aktivitäten lagen weit unter denen,die mit Cytochrom c aus Candida crusei gemessen wurden.
Da die kleineren Chromatiaceae keine Unterschiede in ihren Cytochrommustern aufweisen sollen (persönliche Mitteilung T.Meyer), erscheint es fragwürdig, ob lösliche Cytochrome als in vivo-Akzeptoren der APS - Reduktase fungieren.
Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß in vivo sicherlich andere Verhältnisse herrschen als sie in den in vitro-Versuchen simuliert wurden.

Für die Desulfurikanten wird die in vivo-Beteiligung von Cytochromen an der Sulfitoxidation durch die APS - Reduktase bezweifelt (Bramlett und Peck, 1975; Adachi und Suzuki, 1977).

Verschiedene Autoren beobachteten eine schwache Reaktion der APS - Reduktase mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor (Bowen et al. , 1965; Bramlett und Peck, 1975; Michaels et al. , 1970).

Auch die APS - Reduktase aus T.thioparus (Lyric und Suzuki, 1970b) katalysiert eine schwache O_2-Aufnahme (1 µmol/h); die Autoren weisen jedoch darauf hin, daß FAD (Bestandteil der APS - Reduktase) die gleiche Oxidationsrate hervorzurufen vermag.

Für phototrophe Bakterien konnten Trüper und Peck (1970) an Thiocapsa roseopersicina nachweisen, daß Sauerstoff in begrenztem Umfang Kaliumhexacyanoferrat als Elektronenakzeptor ersetzen kann. Dieser Befund steht im Widerspruch zu eigenen Ergebnissen, bei denen dünnschichtchromatographisch weder bei C.vinosum noch bei C. minutissimum das Endprodukt APS in Abwesenheit von $K_3Fe(CN)_6$ oder Cytochrom c nachgewiesen wurde.

Eigene kinetische Untersuchungen an der solubilisierten APS - Reduktase aus C.vinosum zeigten, daß die Affinitäten für die Substrate AMP und Sulfit im Cytochrom c-gekoppelten Test um den Faktor 2 resp. 3 günstiger ausfielen als bei Einsatz von Kaliumhexacyanoferrat.

Trüper und Rogers (1971) konnten für die APS - Reduktase aus Thiocapsa roseopersicina ähnliche Ergebnisse erzielen, was die Autoren zu der Vermutung führte, Cytochrom c sei der in vivo-Elektronenakzeptor.

Die APS - Reduktasen aus C.vinosum und C.minutissimum (Ulbricht, 1981) zeigen keine so ausgeprägte Nukleotidspezifität, wie es für die Enzyme aus D.desulfuricans (Peck et al. , 1965), T.denitrificans (Bowen et al. , 1966) und C.warmingii (Leyendecker, 1983) festgestellt wurde, die nur Purinnukleotide als Substrate zu verwerten vermögen.
Dagegen können die Enzyme aus C.vinosum und C.minutissimum (Ulbricht, 1981) ebenso wie die aus T.thioparus (Lyric und Suzuki (1970b) und Thiocapsa roseopersicina (Trüper und Rogers, 1971) auch CMP und UMP im $K_3Fe(CN)_6$-gekoppelten Test umsetzen.

Für alle bisher untersuchten APS - Reduktasen wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten bei Einsatz von AMP erzielt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß dieses das in vivo-Substrat darstellt.

Die zum Teil widersprüchlichen Aussagen hinsichtlich der Verwertung verschiedener Nukleotide dürften eher auf unterschiedliche Meßbedingungen (Wahl des Elektronenakzeptors, Reinheitsgrad des angereicherten Präparates, Konzentration der Nukleotide, Wahl des Puffersystems) zurückzuführen sein als auf tatsächlich ausgeprägte Spezifitäten.
So berichtet Leyendecker (1983), die APS - Reduktase aus C.warmingii könne ADP als Substrat akzeptieren.
Da seine Untersuchungen an gereinigten Chromatophorensuspensionen durchgeführt wurden, könnte eine noch im Ansatz befindliche Adenylatkinase für die vermeintliche Umsetzung von ADP verantwortlich sein, in dem sie das ADP in das eigentliche Substrat AMP umwandelt.

Die Auswertung der kinetischen Daten im Lineweaver - Burk-Diagramm ergab für den $K_3Fe(CN)_6$-gekoppelten Test bei C.vinosum eine Substrathemmung durch AMP, während höhere Konzentrationen des Elektronenakzeptors und des Sulfits keinen hemmenden Einfluß auf die Enzymaktivität hatten.
Zu den gleichen Ergebnissen führten die Untersuchungen von Bramlett und Peck (1975), Kirchhoff und Trüper (1974) und Khanna und Nicholas (1983).
Diente Cytochrom c aus Candida crusei als Elektronenakzeptor der APS - Reduktase, wurde auch für Sulfit und Cytochrom c eine Substratinhibierung beobachtet.
Die Ergebnisse stehen in Einklang mit den Befunden von Trüper und Rogers (1971) und Lyric und Suzuki (1970b).

Die solubilisierte APS - Reduktase aus C.vinosum reagierte auf Schwermetallionen äußerst empfindlich.
Eine teilweise Inaktivierung konnte durch Zugabe der Sulfhydrylhemmstoffe pCMB und NEM hervorgerufen werden. Beide Verbindungen bewirken eine stärkere Inhibierung, wenn statt Kaliumhexacyanoferrat Cytochrom c aus Candida crusei fungiert.

Die Ergebnisse weisen auf eine essentielle Bedeutung von SH - Gruppen für die katalytische Substratumsetzung hin.
Das Enzym verhält sich jedoch Jodacetamid gegenüber weitgehend inert, was in Widerspruch zu den Ergebnissen von Khanna und Nicholas (1983) steht.

Azid und Cyanid vermindern die spezifische Aktivität ebenfalls nur im Cytochrom c-gekoppelten Test.
Trüper und Rogers (1971) kamen bei ihren Untersuchungen der APS - Reduktase aus Thiocapsa roseopersicina zu gleichen Ergebnissen und folgerten deshalb, daß die Inhibierung auf die Blockierung des enzymgebundenen Häms zurückzuführen sei. Die Autoren räumen jedoch die Möglichkeit ein, daß das zugefügte Cytochrom durch das Agens bereits inaktiviert werden könnte.

Der Chelatbildner EDTA hat keinerlei Einfluß auf die Aktivität der APS - Reduktase aus C.vinosum. Diese in vitro-Ergebnisse werden bestätigt durch die Untersuchungen von Lyric und Suzuki (1970b).

1.2 Die ADP - Sulfurylase als Schlüsselenzym bei der Umwandlung von Bindungsenergie in ATP

Peck postulierte 1960 aufgrund der von Santer (1958) und Santer et al. (1960) dargelegten Befunde für T.thioparus eine Reaktionsfolge von 3 Enzymen, mit deren Hilfe chemische Bindungsenergie auf dem Wege der Substratphosphorylierung in ATP überführt wird.

Die Schlüsselrolle bei diesem Prozeß nimmt dabei die ADP - Sulfurylase ein. Das energiereiche Sulfat des APS wird in einem nukleophilen Angriff durch Phosphat ersetzt, wobei ADP entsteht, welches in einer nachgeschalteten Reaktion durch die Adenylatkinase in ATP überführt wird.

In phototrophen Bakterien wurde die ADP - Sulfurylase erstmals von Thiele (1966 und 1968) nachgewiesen.
Trüper und Peck (1970) nahmen an, daß die Energiegewinnung durch Substratphosphorylierung bei den phototrophen Bakterien analog zu der bei den Thiobacilli verläuft. Weitere Untersuchungen schienen

die allgemeine Gültigkeit dieser Annahme zu bestätigen (Schug, 1979; Ulbricht, 1981; Khanna und Nicholas, 1983).

1.3 Nachweismethoden

Über die ADP - Sulfurylase existieren in der Literatur wenige Angaben. Dieser Mangel an Information beruht auf der Notwendigkeit, über das Substrat APS in ausreichender Menge zu verfügen.

Das Reaktionsgleichgewicht der ADP - Sulfurylase liegt fast vollständig auf der Seite von Sulfat und ADP, so daß das Enzym nicht in APS - Syntheserichtung gemessen werden kann.
Da das Enzym auch nicht eine Molybdolyse zu katalysieren vermag, wie etwa die ATP - Sulfurylase (Wilson und Bandurski, 1958), ist der Experimentator auf Substratmengen von APS angewiesen.

Das aktivierte Sulfat kann zwar im Handel (mit Mühe) käuflich erworben werden, ist aber sehr teuer, so daß eine Eigensynthese erforderlich ist (Cooper und Trüper, 1979).

1.4 Eigenschaften der untersuchten ADP - Sulfurylasen

Die ADP - Sulfurylasen aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Chromatiaceae zeichneten sich ebenso wie das aus T.denitrificans angereicherte Enzym durch ihre hohe Löslichkeit aus.
Die untersuchten Chromatophorenfraktionen zeigten nur äußerst geringe ADP - Sulfurylaseaktivität.
Zu gleichen Befunden führten die von Thiele (1966) an Thiocapsa roseopersicina und von Khanna und Nicholas (1983) an Chlorobium vibrioforme f.sp. thiosulphatophilum durchgeführten Untersuchungen zur Lokalisation der ADP - Sulfurylase.

In der Hefe ist das Enzym im Cytosol lokalisiert (Adams und Nicholas, 1972), während die aus Spinatblättern isolierte ADP - Sulfurylase membrangebunden an den Chloroplasten vorliegt (Burnell und Anderson, 1973).

Während für die Desulfurikanten die Beteiligung des Enzyms an der APS - Synthese aufgrund der ungünstigen Gleichgewichtslage der Re-

aktion ausgeschlossen (Peck, 1960 und 1962) und in den Hefen eine assimilatorische Funktion als sehr unwahrscheinlich angesehen wurde (Robbins und Lipmann, 1958; Grunberg-Manago et al. , 1966; Adams und Nicholas, 1972) und somit Unklarheit über deren in vivo - Funktion herrscht, wurde die Bedeutung der ADP - Sulfurylase für den dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel in den Thiobacilli (Peck, 1962; Peck und Fisher, 1962), den Chromatiaceae (Trüper, 1975, Trüper und Fischer, 1982) und den Chlorobiaceae (Khanna und Nicholas, 1983) oft betont.

In allen untersuchten Organismen ließen sich bei wachstumsphysiologischen Untersuchungen zum Vorkommen der ADP - Sulfurylase deutliche Korrelationen zwischen der spezifischen Aktivität des Enzyms einerseits und der jeweiligen Wachstumsphase und den physiologischen Anzuchtsbedingungen anderseits erkennen.
Bei autotropher Anzucht erreicht die ADP - Sulfurylase ihre jeweils höchste spezifische Aktivität zu einem Zeitpunkt, an dem dem Enzym vom Organismus (über die APS - Reduktase) eine maximale Menge an aktiviertem Sulfat zur Verfügung gestellt wird.
In Chromatium minutissimum konnte die ADP - Sulfurylase unter heterotrophen Wachstumsbedingungen ebensowenig wie die APS - Reduktase zu keinem Zeitpunkt des Wachstums nachgewiesen werden.
Diese Beobachtungen machen eine wachstumsphysiologische Regulation beider Enzyme durch gemeinsame Parameter wahrscheinlich.

Auch in Thiobacillus thiooxidans waren die spezifischen Aktivitäten der ADP - Sulfurylase von den Anzuchtsbedingungen abhängig (Tuovinen et al., 1976), während in Thiobacillus ferrooxidans eine solche Korrelation nicht beobachtet wurde (Kelley et al. , 1976).

In Chromatium gracile konnte eine ADP - Sulfurylase nachgewiesen werden, die wie das Enzym der anderen untersuchten Organismen einen typischen Bezug zur Wachstumsphase erkennen ließ. Im Gegensatz zu den anderen Organismen konnte APS - Reduktase nicht nachgewiesen werden. Vergleichende kinetische und strukturelle Untersuchungen ergaben für alle ADP - Sulfurylasen große Übereinstimmungen in ihren Eigenschaften (Tabelle 25).

Die typische wachstumsabhängige Ausprägung der spezifischen Aktivität und die weitgehende Übereinstimmung in physiologisch struk-

tureller Hinsicht schließen eine Sonderstellung der ADP - Sulfurylase aus Chromatium gracile gegenüber den anderen Enzymen aus. Über die eigentliche Funktion des Enzyms bei Fehlen einer APS - Reduktase kann keine Aussage gemacht werden.

Tabelle 25: Charakteristische Daten der untersuchten ADP - Sulfurylasen

Eigenschaft	Chromatium vinosum	Chromatium gracile	Chromatium minutissimum	Chromatium warmingii	Thiobacillus denitrificans	Backerhefe
Membrangebunden	nein	nein	nein	nein	nein	ja
pH-Optimum	8,5	9,3	8,1	8,9	9,0	7,4
Hitzetolerant $>T_{50}<$	nein 43 C/15 min	nein 48°C/15 min	nein 55°C/15min	nein 37°C/15 min	nein 55°C/10 min	nein n.b.
Spezifische Aktivität	5,57 Units	8,16 Units	14,9 Units	8,9 Units	37 Units	16 Units
K_m für P_i	0,256 mM	0,109 mM	1,4 mM	0,045 mM	0,129 mM	1,5 mM
K_m für APS	0,167 mM	0,227 mM	0,77 mM	0,392 mM	0,416 mM	0,5 mM
Molekulargewicht	176 000	190 000	158000	195 000	190 000	150 000-200 000
Hemmung durch Schwermetallionen SH-Inhibitoren	ja ja	ja ja	ja ja	ja ja	ja ja	ja ja
Wachstumsabhängg	ja	ja	ja	ja	ja	n.b.

Die Daten für T.denitrificans wurden der Arbeit von Schug (1979) entnommen, während die für Bäckerhefe den Veröffentlichungen von Grunberg-Manago et al. (1966) und Adams und Nicholas (1972) entnommen wurden.

Die aus den Chromatiaceae angereicherten Enzympräparate verloren während einer Lagerung bei -18°C rasch ihre Aktivität, wenn sie in geringen Proteinkonzentrationen vorlagen.
Eine Ausnahme bildete lediglich das aus Chromatium minutissimum angereicherte Enzym, das unter den gleichen Bedingungen nach einer einmonatigen Lagerungszeit noch über ca. 30% seiner Ausgangsaktivität verfügte.
Eine größere Stabilität zeigte die von Schug (1979) beschriebene ADP - Sulfurylase aus Thiobacillus denitrificans.
Auch Khanna und Nicholas (1983) berichten über die große Instabili-

tät der von ihnen untersuchten ADP - Sulfurylase aus Chlorobium vibrioforme f.sp.thiosulphatophilum.
Das Enzym konnte durch Zugabe des Chelatbildners EDTA und des SH-Agens Mercaptoethanol stabilisiert werden.

Ganz allgemein scheinen an der Reaktion der ADP - Sulfurylasen essentielle SH - Gruppen beteiligt zu sein, da Sulfhydrylhemmstoffe wie pCMB und NEM die Aktivitäten der Enzyme drastisch vermindern können (Adams und Nicholas, 1972; Burnell und Anderson, 1973; Schug, 1979, Khanna und Nicholas, 1983).
Alle Autoren beschreiben, daß die durch SH - Inhibitoren hervorgerufene partielle Hemmung durch Zugabe von Sulfhydrylgruppen enthaltenden Substanzen teilweise wiederaufgehoben wurde.
Dieser Effekt wurde auch für Chromatium minutissimum beobachtet (Ulbricht, 1981).

Die Aktivitäten der ADP - Sulfurylasen erstrecken sich über ein breites pH-Spektrum.
Während die aus Bäckerhefe isolierte ADP - Sulfurylase maximale Umsätze bei pH 7.4 (Grunberg-Manago et al. , 1966) bzw. 7.5 (Adams und Nicholas, 1972) zeigt, wurde für das aus Spinatblättern isolierte Enzym (Burnell und Anderson, 1973) das pH-Optimum mit 8.0 ermittelt.
Für die aus den Chromatiaceae angereicherten ADP - Sulfurylasen findet eine optimale Umsetzung der Substrate unter basischeren Bedingungen statt. Sie weisen damit eine Übereinstimmung mit dem aus T.denitrificans isolierten Enzym auf (Schug, 1979).
Lediglich die ADP - Sulfurylase aus Chromatium minutissimum zeigt ein ähnlich pH - abhängiges Verhalten wie das aus Spinatblättern angereicherte Enzym (Burnell und Anderson, 1973).

Über das Molekulargewicht der ADP - Sulfurylasen liegen nur wenige Angaben vor.
So wurde das Molekulargewicht des Hefeenzyms von der Arbeitsgruppe um Grunberg-Manago (1966) mit 150 000 - 200 000 angegeben.
Für T.denitrificans wurde von Schug ein Molekulargewicht von 190 000 ermittelt.
Die im Zuge der Untersuchungen zur Charakterisierung der ADP - Sulfurylase an diesem Organismus hier vorgenommenen Untersuchungen

führten zu ähnlichen Ergebnissen.
Da auch in den Chromatiaceae die Molekulargewichte nur in einem geringen Bereich schwankten (160 000 - 200 000) und somit in vergleichbaren Größenordnungen vorlagen, könnte auf eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen allen bisher untersuchten ADP - Sulfurylasen geschlossen werden.

Die Aufnahmen der Substratsättigungskurven führten wie bei den Enzymen aus T.denitrificans (Schug, 1979) und der Hefe (Adams und Nicholas, 1972) bei den Chromatiaceae zu hyperbolischen Kurven. Dabei lagen die Affinitäten für APS in vergleichbaren Größenordnungen (10^{-4}M), während die K_m-Werte für Phosphat einer größeren Streubreite unterlagen.
Die ADP - Sulfurylase aus Chromatium warmingii besaß von allen untersuchten Enzymen die höchste Affinität zum Phosphat (K_m= 0.045 mM), während das aus Chromatium minutissimum isolierte Enzym eine um den Faktor 25 geringere Affinität hatte und damit einen ähnlichen Wert einnahm, wie er für das Hefeenzym von Grunberg-Manago et al. (1966) beschrieben wurde.

Für die ADP - Sulfurylase aus Chlorobium vibrioforme f.sp.thiosulphatophilum konnten in der doppelt reziproken Auftragung für das Substrat Phosphat nur dann lineare Beziehungen beobachtet werden, wenn die APS - Konzentration unter 0.2 mM lag (Khanna und Nicholas, 1983). Zudem nahmen die K_m-Werte für APS mit steigender Phosphatkonzentration ab; sie variierten zwischen 0.25 mM und 0.77 mM. Khanna und Nicholas vermuten das Vorliegen eines ternären Enzymkomplexes.
Eigene Untersuchungen können die Allgemeingültigkeit dieser Annahme nicht bestätigen.

1.5 Vergleichende Darstellung der ATP - Sulfurylasen

Die ATP - Sulfurylase ist in der Natur weit verbreitet und aus Mikroorganismen, Pflanzen, und Tieren isoliert, charakterisiert und beschrieben worden (Hawes und Nicholas, 1973).
Das für den assimilatorischen Schwefelstoffwechsel wichtige Enzym

wurde in fast allen Fällen über den von Wilson und Bandurski (1958) entwickelten Molybdattest nachgewiesen.

Durch die Verwendung des physiologischen Substrats APS konnten für die ATP - Sulfurylasen aus T.denitrificans und C.warmingii kinetische Untersuchungen in der dissimilatorischen Richtung durchgeführt werden.

Beide Organismen zeichneten sich durch den Besitz einer ATP - Sulfurylase aus, die in unterschiedlichen Wachstumsphasen verschieden hohe spezifische Aktivitäten aufweist.
Maximale Aktivität kann bei beiden Organismen immer dann festgestellt werden, wenn auch die APS - Reduktase als das substraterzeugende Enzym ihr Aktivitätsmaximum durchläuft.
Wie Tabelle 26 zeigt, weisen beide ATP - Sulfurylasen auch sonst starke strukturelle und physiologische Ähnlichkeiten auf.

Tabelle 26: Einige Eigenschaften der ATP - Sulfurylasen aus Thiobacillus denitrificans und Chromatium warmingii

Eigenschaft	Chromatium warmingii	Thiobacillus denitrificans RT
Spezifische Aktivitat	3,7	57,4
Molekulargewicht	260000	215000
pH-Optimum	7,5	8,0
Temperaturoptimum	37° C	35° C
Wachstumsabhängigkeit	++	++
$K_{(m)}$ für APS $K_{(m)}$ für PP	$6,4\times10^{-5}$ M $8,3\times10^{-6}$ M	$7,1\times10^{-5}$ M $1,7\times10^{-5}$ M
Hemmung durch ATP	++	++

Die dissimilatorischen ATP - Sulfurylasen aus Chromatium warmingii und T.denitrificans unterscheiden sich in ihren Eigenschaften nicht gravierend von den assimilatorischen.

Wie bei Pilzen (Tweedie und Segel, 1971), Hefen (Hawes und Nicholas, 1973) und anderen Bakterien (Akagi und Campbell, 1962) lassen sich bei beiden Organismen in den Membranfraktionen nur geringe Aktivitäten nachweisen. So konnten in der Alge Spirulina platensis (Manon und Varma, 1978) in der Partikelfraktion nur 1.15% der Gesamtaktivität nachgewiesen werden.

Während eine Korrelation zwischen der spezifischen Aktivität und der Wachstumsphase bisher für keine ATP - Sulfurylase beschrieben wurde, wird durch zahlreiche Arbeiten belegt, daß die Aktivitätsausprägung in charakteristischer Weise von den Anzuchtsbedingungen abhängig ist (Tweedie und Segel, 1971; Kelley et al. , 1976; Burnell und Whatley, 1980).

Allen ATP - Sulfurylasen gemeinsam ist auch der Bedarf für Mg^{2+}-Ionen; als eigentliches Substrat der katalytischen Umsetzung wird deshalb ein MgATP-Komplex (Bitchnell et al. , (1982) angenommen.

Zudem sind fast alle ATP - Sulfurylasen gegenüber kleineren pH-Schwankungen unempfindlich, verfügen über ein breites pH - Optimum, dessen Maximum in der Regel zwischen pH 7 und pH 8 liegt (Kelley et al. , 1976; Levi und Wolf, 1969; Hawes und Nicholas, 1973; Akagi und Campbell, 1962).

Die Substrataffinitäten aller bisher charakterisierten Enzyme liegen im µmolaren Bereich (Shaw und Anderson, 1974; Onajobi et al. , 1973; Levi und Wolf, 1969; Kelley et al. , 1976).
Bei der Erstellung der Reaktionskinetiken stellten Shaw und Anderson (1974) fest, daß die Affinitäten ihres aus Spinatblättern isolierten Enzyms konzentrationsabhängig zum jeweils anderen Substrat waren. Sie schlugen deshalb für die ATP - Sulfurylase einen Ping-Pong Reaktionsmechanismus vor.
Levi und Wolf (1969) waren hinsichtlich des Reaktionsmechanismus zu den gleichen Schlußfolgerungen gekommen, zumal sie einen sulfatunabhängigen Austausch zwischen ATP und PP_i feststellten.
Die Untersuchungen an T.denitrificans und C.warmingii hingegen

zeigten unter den getesteten Bedingungen keinerlei gegenseiti-Einflußnahme der Substrate auf die Affinität des Enzyms zum zweiten Substrat. Die Versuchsergebnisse werden durch die Befunde von Tweedie und Segel (1971) und Hawes und Nicholas (1973) bestätigt. Die beiden letztgenannten Autoren nehmen für ihre ATP - Sulfurylase einen sequentiellen Reaktionsmechanismus an.
Neuere Untersuchungen von Bitchnell et al. (1982) lassen für das Hefeenzym einen geordneten sequentiellen Reaktionsmechanismus annehmen.
Die unterschiedlichen Mechanismen bei der Substratumsetzung können auf eine physiologische Verschiedenheit zwischen den einzelnen ATP - Sulfurylasen hindeuten.
Auch die große Streubreite bei den Molekulargewichten (40 000 - 900 000; Onajobi et al. , 1973; Levi und Wolf, 1969) deutet auf die potentielle Möglichkeit einer unterschiedlichen Aufgabenstellung der einzelnen ATP - Sulfurylasen hin.

Ein besonderes Phänomen wiesen Kelley et al. (1976) für die ATP - Sulfurylase aus T.ferrooxidans nach.
Wurde der Organismus auf Eisen angezogen, wies die ATP - Sulfurylase für APS eine negative Kooperativität auf. Bei einer Anzucht auf Thiosulfat hingegen trat dieser Regulationseffekt nicht ein.
Unter den letztgenannten Anzuchtsbedingungen konnte auch keine Sulfatassimilation nachgewiesen werden, so daß die Vermutung entstehen könnte, daß APS nur auf eine assimilatorische ATP - Sulfurylase einen regulativen Einfluß auszuüben vermag und es sich um 2 destinkte Enzyme handelt.

1.6 Pyrophosphatasen als Substratkonkurrenten der ATP - Sulfurylasen

Hochaktive Pyrophosphatasen sind für alle Organismen von großer physiologischer Bedeutung.
So überraschte es nicht, daß das Enzym in T.denitrificans und Chromatium warmingii in hohen spezifischen Aktivitäten nachgewiesen wurde.

Der intrazelluläre Gehalt an Pyrophosphat beeinflußt entscheidend

die Regulation zahlreicher Enzyme, unabhängig davon, ob Pyrophosphat direkt oder indirekt an der katalytischen Umsetzung beteiligt ist (Kleppe, 1966; Pina et al. , 1975; Sawhney und Nicholas, 1978; Wheeler und Lowenstein, 1980).
Fast in allen Fällen übt PP_i einen inhibitorischen Einfluß aus (Khandelwal, 1978; Khandelwal und Kamanei, 1980).
Die intrazelluläre Pyrophosphatkonzentration hängt hauptsächlich von der Aktivität der Pyrophosphatase ab (Lahti, 1983).
Dabei sind in der Regel mehr als 90% der Pyrophosphatasegesamtaktivität im löslichen Cytoplasma lokalisiert (Josse, 1966; Howard und Lundgren, 1970; Tominaga und Mori, 1977).
Die Pyrophosphatasen aus C.warmingii und T.denitrificans verhalten sich entsprechend dieser Norm.
Wie Wachstumsexperimente ergaben, werden die Pyrophosphatasen zwar kontinuierlich, aber während der einzelnen Wachstumsphasen in unterschiedlich hoher spezifischer Aktivität ausgebildet.
Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Starr und Oginsky (1972) bei ihren Untersuchungen zur Pyrophosphatase aus Streptococcus faecium.
Dort erreicht das Enzym seine höchste spezifische Aktivität in der exponentiellen Wachstumsphase.
Lahti und Heinonen (1981) stellten an Streptococcus faecalis fest, daß die Menge an Pyrophosphatase während des Wachstums konstant bleibt, die spezifische Aktivität jedoch vom Alter der Kultur abhängig ist.
In E.coli hingegen hängt die spezifische Aktivität der Pyrophosphatase weder von der Zusammensetzung des Mediums, noch der Wachstumsphase oder den vorherrschenden Bedingungen der Proteinbiosynthese ab (Josse, 1966).
Gegen diese Behauptung sprechen die Befunde von Dignam und Deutscher (1979), die nachwiesen, daß die Pyrophosphatase als Stimulator der Proteinbiosynthese agiert, indem sie das anfallende PP_i beseitigt, das einen potenten Inhibitor der Aminoacyl-tRNA-Synthetase darstellt.

Schon lange ist bekannt, daß ein $MgPP^{2-}$-Komplex den Pyrophosphatasen als Substrat dient und freies PP_i, das also nicht mit Metallionen komplexiert vorliegt, als starker Enzyminhibitor wirkt (Kunitz, 1952; Bloch-Frankenthal, 1954; Robbins et al. , 1955).

Ausnahme von dieser Regel bilden lediglich die Pyrophosphatasen von Entamoeba histolytica und die des menschlichen Serums (McLaughlin, 1978; Hörder, 1974).

Darüber hinaus vermag Mg^{2+} als positiver Effektor auf die Pyrophosphatase einzuwirken (Horn et al. , 1967; Cooperman und Chiu, 1973). Klemme (1976) nimmt deshalb an, daß unter bestimmten Bedingungen, etwa bei einem hohen energy charge, die für die Pyrophosphatase verfügbare intrazelluläre Konzentration an Magnesiumionen so gering ist, daß sie auf die enzymatische Hydrolyse des PP_i limitierend wirkt. Diese Interpretation würde auch eine Erklärung für den merklichen Abfall der Pyrophosphataseaktivität in C.warmingii und T.denitrificans während des fortschreitenden Wachstums bieten.

Eine weitere Erklärung für eine wachstumsabhängige Ausbildung in der spezifischen Aktivität der Pyrophosphatase geben Lahti und Heinonen (1981). Sie beobachteten in Streptococcus faecalis das Vorkommen von 2 Pyrophosphatase-Formen, die ineinander überführt werden konnten und sich in ihren Aktivitäten voneinander unterschieden. Während der frühen exponentiellen Wachstumsphase befindet sich das Enzym fast ausschließlich in der hochaktiven Form, wohingegen in der stationären Phase das wenig aktive Enzym in vergleichbaren Quantitäten vorkommt.
Das Gleichgewicht zwischen den beiden Enzymformen wird in vivo durch die intrazelluläre Rate von reduziertem zu oxidiertem Glutathion reguliert (Lahti und Suonpää, 1982).
Diese Regulationsform war zuvor durch in vitro Experimente bei anderen Organismen vorgefunden worden (Lahti und Mauuksela, 1981).

Da ATP - Sulfurylase und die Pyrophosphatase um das gleiche Substrat konkurrieren, mußten Untersuchungen zur Substrataffinität vorgenommen werden.
Die zur Ermittlung der K_m-Werte der betreffenden Pyrophosphatasen durchgeführten Untersuchungen standen unter dem Vorzeichen, daß sich das eigentliche Substrat $MgPP^{2-}$ im wässrigen Milieu in zahlreiche verschiedene Effektoren aufspaltet.
Dabei können zwar die Konzentrationen aller Effektoren exakt berechnet werden, wenn die Gesamtkonzentration an Magnesium und PP_i, der vorherrschende pH und die Stabilitätskonstanten der einzelnen Bil-

dungskomplexe bekannt sind (Josse, 1966; Klemme und Gest, 1971), aber die dazu notwendigen Berechnungen nehmen sehr viel Zeit in Anspruch. Erschwerend kommt hinzu, daß die Stabilitätskonstanten mit steigender Temperatur zu- und mit erhöhter Ionenkonzentration laut Hörder (1974) abnehmen.

Bei der Erstellung der Kinetiken wurde von der Annahme ausgegangen, daß die äquimolaren Testmengen von Magnesium und PP_i sich zum $MgPP_i^{2-}$-Komplex (dem eigentlichen Substrat) zusammensetzen, während der Einfluß der anderen entstehenden Ionen und Komplexverbindungen vernachlässigt wurde.
Um die ionalen Einflüsse so gering wie möglich zu halten, wurden die Messungen bei einem pH von 9 durchgeführt.

Unter diesen Bedingungen zeigten die Pyrophosphatasen aus C.warmingii und T.denitrificans bei doppelt reziproker Auftragung im Lineweaver - Burk Diagramm einen linearen Verlauf.
Auch die Pyrophosphatasen aus T.ferrooxdans (Howard und Lundgren, 1970), Rps.capsulata und Rps.spaeroides (Klemme et al. , 1971) verhielten sich entsprechend der Michaelis-Menton Kinetik, während einige Autoren sigmoide Sättigungskurven bei anderen Pyrophosphatasen nachwiesen (Horn et al. , 1967; Klemme und Gest, 1971 ; Rapoport et al. , 1972).

Lahti (1983) weist darauf hin, daß die Aufnahme von Substratsättigungskurven in besonderem Maße von den angewendeten experimentellen Bedingungen abhängig sind.
Lediglich für die Pyrophosphatase aus S.cerevisiae konnte bisher eindeutig ein heterotropher Effekt nachgewiesen werden (Cooperman und Chiu, 1973a und 1973b).

1.7 Enzymatische Nutzungskriterien der im APS enthaltenen Energie

Im assimilatorischen Schwefelmetabolismus katalysiert die ATP - Sulfurylase den nukleophilen Austausch des Phosphatanteils im ATP durch ein Sulfation, wobei es zur Bildung des aktiverten Sulfats und zur Freisetzung von PP_i kommt. Die Änderung der freien Energie beträgt dabei 46 kJ/M (Robbins und Lipmann, 1958).
Um diese Synthese durchführen zu können, läuft die Reaktion im Orga-

nismus gekoppelt mit anderen enzymatischen Reaktionen ab: anorganisches Pyrophosphat wird durch die Pyrophosphatase hydrolysiert, während das APS über die APS - Kinase in PAPS überführt werden könnte. Auf diese Weise könnten beide Reaktionsprodukte dem Reaktionsgleichgewicht entzogen werden.
In anderen Organismen wird APS durch einen sofortigen Transfer der Sulfogruppe auf einen Carrier übertragen, wo es auf die Sulfhydrylstufe reduziert wird (Imhoff, 1982).

Thiobacillus denitrificans Stamm RT und Chromatium warmingii sind nicht zu einer Synthese schwefelhaltiger Aminosäuren aus Sulfat befähigt (Schedel und Trüper, 1979; Trüper und Pfennig, 1982).
Die Organismen verfügen jedoch über hohe Aktivitäten einer ATP - Sulfurylase, die in der gleichen Größenordnung vorliegen wie die der APS - Reduktase und der ADP - Sulfurylase.
Deshalb erscheint bei den genannten Organismen eine Beteiligung der ATP - Sulfurylase am assimilatorischen Schwefelmetabolismus als unwahrscheinlich.

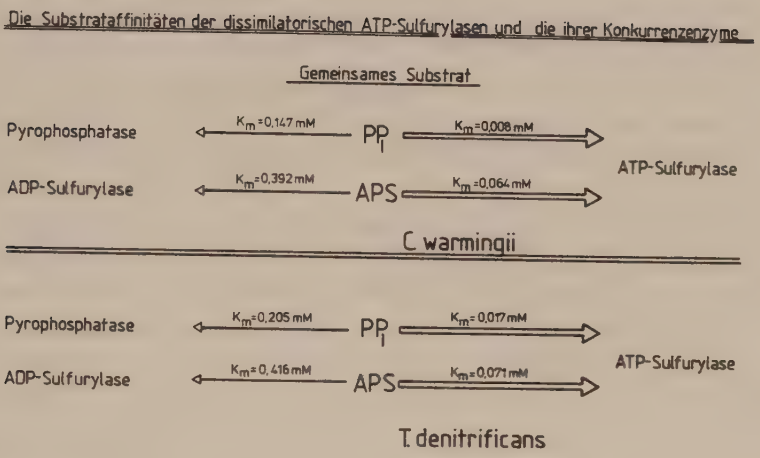
Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Beobachtungen von Kelley et al. (1976), die in T.thiooxidans eine hochaktive ATP - Sulfurylase nachwiesen, obwohl der Organismus unter den getesteten Bedingungen nicht zu einer Sulfatassimilation befähigt war.

Im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel konkurriert die ATP - Sulfurylase mit der ADP - Sulfurylase und der anorganischen Pyrophosphatase um die gemeinsamen Substrate APS und PP_i.
Wie vergleichende kinetische Studien eindeutig zeigten, zeichnet sich die ATP - Sulfurylase in T.denitrificans und C.warmingii durch höhere Affinitäten zu den entsprechenden Substraten aus als ihre Konkurrenten (vergleiche Abb. 29).

Findet eine Substratphosphorylierung unter Beteiligung der ATP - Sulfurylase statt, wird das aktivierte Sulfat stöchiometrisch in äquimolare Menge ATP umgesetzt.
Tritt hingegen ADP - Sulfurylase als das energiekonservierende Enzym bei der Substratphosphorylierung auf, sind 2 Mole APS zur Erzeugung von 1 Mol ATP erforderlich.

Das 2. Substrat der ATP - Sulfurylase, das anorganische Pyrophosphat,

Abbildung 29:



tritt als Nebenprodukt zahlreicher Biosynthesereaktionen auf. ATP - Sulfurylase und Pyrophosphatase konkurrieren um das gleiche Substrat, wobei auch in diesem Fall die ATP - Sulfurylasen aus C. warmingii und T.denitrificans über die höheren Affinitäten zum PP_i verfügen.

Durch die enzymatische Umwandlung beider Substrate erschließt die dissimilatorische ATP - Sulfurylase der beiden untersuchten Organismen nicht nur die aus dem Schwefelstoffwechsel resultierende Energie, sondern konserviert auch die im Pyrophosphat enthaltene Bindungsenergie.

Solange die Zelle über die Proteinbiosynthese oder ähnliche Reaktionen (Kornberg, 1962) ausreichend Pyrophosphat produziert, kann über die ATP - Sulfurylase der doppelte Energiebetrag gewonnen werden wie durch die gemeinsamen Reaktionen von ADP - Sulfurylase und Adenylatkinase.

Bereibt die Zelle eine intensive Proteinbiosynthese, mag der Haupt-

weg der Substratphosphorylierung über die ATP - Sulfurylase ablaufen. Verringert sich die Proteinbiosynthesrate jedoch, steht der ATP - Sulfurylase nicht mehr in ausreichendem Maße PP_i zur Verfügung, so daß nun die ADP - Sulfurylase in einer günstigeren Lage ist, das aktivierte Sulfat umzuwandeln.

Auch über andere Faktoren könnte eine Regulation des Mechanismus der Substratphosphorylierung erfolgen.
Zur Entfaltung ihrer enzymatischen Aktivität benötigt die ATP - Sulfurylase Mg^{2+}-Ionen (Farley et al. , 1979; Levi und Wolf, 1969; Akagi und Campbell, 1962), während ADP - Sulfurylasen durch Metallionen nicht weiter aktiviert werden.
Während des Zellwachstums erhöht sich der energy charge und die steigende Konzentration an ATP könnte mit einer Chelatisierung an freien Mg^{2+}-Ionen einhergehen, so daß der ATP - Sulfurylase nicht mehr in ausreichendem Maße die benötigten Metallionen zur Verfügung stehen.

Wie Inhibierungsexperimente mit der ATP - Sulfurylase aus Thiobacillus denitrificans zeigten, ist nichtkomplexiertes ATP ein potentieller nichtkompetitiver Inhibitor der ATP - Sulfurylase.

Über einen ähnlichen Effekt berichten Hawes und Nicholas (1973), die zeigen konnten, daß freies ATP die Aktivität der ATP - Sulfurylase in Hefe stark inhibiert.
Wie Tweedie und Segel (1971) nehmen sie an, daß ein MgATP - Komplex das eigentliche Substrat der ATP - Sulfurylase ist.

Auch in anderen Thiobacilli wurden hohe Aktivitäten einer ATP - Sulfurylase nachgewiesen.
So fand Peck (1960) in Thiobacillus thioparus eine ATP - Sulfurylase, die 10 - 20 x aktiver war als das entsprechende Hefeenzym. Wegen der Untersuchungsergebnisse von Santer und Mitarbeitern (1960) schloß er jedoch eine Beteiligung des Enzyms an der Substratphosphorylierung aus. Die Arbeitsgruppe um Santer hatte nachweisen können, daß zur vollständigen Oxidation der Schwefelquelle Thiosulfat katalytische (Substrat-) Mengen an Phosphat benötigt werden.

Peck und Fisher (1962) versuchten den experimentellen Nachweis für die von Peck (1960) geforderte Reaktionssequenz der Substratphosphorylierung in Thiobacillus thioparus zu erbringen.
Um eine mit der Sulfitoxidation einhergehende Bildung von ADP über

die ADP - Sulfurylase nachweisen zu können, blockierten sie die in ihrem Ansatz enthaltene Adenylatkinase durch Zugabe von Fluorid und EDTA.
Da aber die ATP - Sulfurylase ebenfalls durch EDTA und Fluorid inhibiert wird, mußte die Substratphosphorylierung fast zwangsläufig über die ADP - Sulfurylase ablaufen.
Unter den genannten Reaktionsbedingungen konnte eine Beteiligung der ATP - Sulfurylase am dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel natürlich nicht nachgewiesen werden.

In Thiobacillus ferrooxidans liegt die Aktivität der ATP - Sulfurylase eindeutig unter der der ADP - Sulfurylase. Deshalb nahmen Tuovinen et al. (1976) an, daß die ATP - Sulfurylase nur eine untergeordnete Rolle bei der Substratphosphorylierung einnehmen würde.

Die Arbeitsgruppe um Kelley (1976) schloß eine Beteiligung der ATP - Sulfurylase am dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel in Thiobacillus thiooxidans aus.
Bei ihren Überlegungen wurden sie von der Annahme geleitet, das zur Enzymkatalyse benötigte Pyrophosphat müsse zuvor erst durch die Pyrophosphatase gebildet werden, was ihnen jedoch wegen der thermodynamisch ungünstigen Gleichgewichtslage der Reaktion als unwahrscheinlich erschien.

In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen wies Aminuddin (1981) für Thiobacillus denitrificans eine Beteiligung der ATP - Sulfurylase an der Energiegewinnung durch Substratphosphorylierung nach.
Die Durchführung von Inhibitorexperimenten führte Aminuddin zu der Schlußfolgerung, daß die Adenylatkinase unter den Bedingungen der Substratphosphorylierung nicht auf dem Hauptweg der ATP - Gewinnung liegt.
Als möglichen Weg der Substratphosphorylierung bot er einen Reaktionsmechanismus an, in dem das von der ATP - Sulfurylase benötigte PP_i durch die anorganische Pyrophosphatase synthetisiert wird.
Die Literatur gibt einige Hinweise auf eine lichtabhängige Pyrophosphatproduktion durch membrangebundene Pyrophosphatasen (Baltscheffsky et al. , 1966; Guillory und Fisher, 1972).
In diesen Fällen erzeugt die Pyrophosphatase ähnlich einer H^+ - ATPase ein elektrochemisches Potential von H^+ - Ionen an den Membranen (Kondrashin et al. , 1980).

Kommt es unter den genannten Bedingungen zu einer von der Pyrophosphatase katalysierten Neusynthese von Pyrophosphat, wird gleichzeitig die Pyrophosphathydrolyse einer Derepression unterworfen (Nishikawa et al. , 1973).
Da aber während der Biosyntheseleistungen der Zellen hohe Mengen an Pyrophosphat gebildet werden und bekannt ist, daß ein hoher Pyrophosphatspiegel in der Zelle zahlreiche Enzymsysteme negativ beeinflußt (Lahti, 1983), erscheint die von Aminuddin (1981) geforderte Biosynthese des PP_i über die Pyrophosphatase nicht überzeugend, zumal der Autor den Nachweis einer membrangebundenen PP_i-produzierenden anorganischen Pyrophosphatase schuldig bleibt.

Eine Nettoproduktion von Pyrophosphat stellt einen thermodynamisch kostspieligen Prozeß dar.
Wenn das von der ATP - Sulfurylase benötigte Pyrophosphat tatsächlich erst neu synthetisiert werden müßte, würde eine Substratphosphorylierung unter Einbeziehung der Enzyme ADP - Sulfurylase und Adenylatkinase sinnvoller erscheinen, da auf diesem von Peck (1960) postuliertem Weg keine zusätzliche Energie für die Umwandlung des aktivierten Sulfats aufgewendet werden müßte.

Durch die Ausnutzung der im Pyrophosphat enthaltenen Bindungsenergie durch die ATP - Sulfurylase sind T.denitrificans und C.warmingii in der Lage, eine sinnvolle Verknüpfung zwischen der Biosyntheseleistung der Zelle (bei der PP_i als Neben- oder besser Abfallprodukt vieler Reaktionen entsteht) und dem dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel herzustellen, so daß sie den größtmöglichen Energiegewinn durch ökonomische Ausnutzung der Energiequellen erzielen.

1.8 Pyrophosphat-abhängige Enzyme

Die ATP - Sulfurylase ist nicht das einzige Enzym, welches in der Lage ist, das in der Phosphoanhydridbindung des Pyrophosphats enthaltene hohe chemische Bindungspotenitial (ca. 33kJ/Mol; Wood et al., 1966) zu nutzen.

Die intrazelluläre Pyrophosphatkonzentration liegt mit 0.1 - 1 mM (vergleiche Floodgaard (1970) und Reeves et al. (1974) etwa

in der gleichen Größenordnung wie die anderer Substanzen, die am Energiemetabolismus der Zelle teilnehmen.

Da zudem während der Biosynthese große Mengen an Pyrophosphat freigesetzt werden (bei R.rubrum 7.4 µmol/mg Biomasse; Klemme, 1976), erscheint die Frage berechtigt, ob PP_i einzig durch die Pyrophosphatase dem Reaktionsgleichgewicht der betreffenden Bildungsreaktion entzogen wird, da so die im PP_i enthaltene Bindungsenergie durch deren Hydrolyse für den Organismus verloren geht.

Bereits 1966 war von Wood und Mitarbeitern die Vermutung geäußert worden, daß die Propionsäurebakterien wegen ihrer außergewöhnlich hohen Wachstumserträge in der Lage sein müßten, die Phosphoanhydridenergie des PP_i für Biosyntheseleistungen ausnutzen zu können.

In der Folgezeit wurden mit der PEP:Carboxytransphosphorylase (Lochmüller et al. , 1966), der Pyruvat:Phosphat-Dikinase (Evans und Wood, 1968), der Phosphat:L-Serin-Phosphotransferase (Cagen und Friedmann, 1972) und der Pyrophosphat:D-Fructose-6-Phosphat-1-Phosphotransferase (O'Brien et al. , 1975) in dieser Organismengruppe 4 Pyrophosphat-abhängige Transphosphorylasen gefunden.

Auch Entamoeba histolytica verfügt (Reeves, 1968; Reeves et al. , 1974 und 1976; Reeves und Guthrie, 1975) ebenso wie einige phototrophe Bakterien (Baltscheffsky et al. , 1966; Buchanan, 1974) über Pyrophosphat-abhängige Transphosphorylasen.
Diese Enzyme übertragen eine der beiden Phosphatgruppen auf einen organischen Akzeptor und konservieren somit zumindest einen Teil der in der P~P-Bindung gespeicherten (chemischen)Energie.

In R.rubrum vermag Pyrophosphat als Energielieferant für energiegebundene Transhydrogenierungen (Keister und Minton, 1969), Cytochrom-Reduktionen (Baltscheffsky et al. , 1966) und NAD^+-Reduktionen (Keister und Yike, 1976) zu dienen.

Bei den sulfatreduzierenden Bakterien sind nur die Desulfotomacula in der Lage, die im Pyrophosphat enthaltene Bindungsenergie in ausreichendem Maße für ihren Stoffwechsel nutzbar zu machen (Liu und Peck, 1981).
Während in typischen Vertretern der Desulfovibrio hohe Aktivitäten der Pyrophosphatase nachgewiesen wurden (Akagi und Campbell, 1963)

wurden in den untersuchten Desulfotomacula nur Bruchteile der entsprechenden Aktivität nachgewiesen (Liu und Peck, 1981).

Statt der Pyrophosphatase verfügten diese Organismen mit der Pyrophosphat:Acetatkinase über ein Enzym, welches analog zur ATP - Sulfurylase aus C.warmingii und T.denitrificans die im Pyrophosphat enthaltene Energie der Zelle biologisch erschließt.
Die Aktivitäten der Pyrophosphat:Acetatkinase sind dabei in der Höhe mit denen vergleichbar, die die Pyrophosphatasen bei den Vertretern der Desulfovibrio einnehmen (Liu und Peck, 1981).

Die Desulfotomacula metabolisieren das während der Sulfataktivierung anfallende PP_i über die Pyrophosphat:Acetatkinase und regenerieren pro Mol umgesetztem PP_i über die Acetatkinase ein Mol ATP (Peck und LeGall, 1982).
Somit produzieren die Desulfotomacula bei Wachstum auf Sulfat und Lactat eine energiereiche Phosphatbindung pro reduziertem Sulfation.

Im Gegensatz zu den Desulfotomacula sind die Vertreter der Desulfovibrio auf eine oxidative Phosphorylierung unter den gleichen Wachstumsbedingungen angewiesen (Barton et al. , 1972), um das zum Wachstum benötigte ATP zu erhalten.

Bei ihnen konnte die Pyrophosphat:Acetatkinase nur in Spuren nachgewiesen werden (Liu und Peck, 1981).

Zusammenfassung

1. Thiobacillus denitrificans Stamm RT verfügt neben der ADP - Sulfurylase mit einer dissimilatorischen ATP - Sulfurylase über ein weiteres Enzym, das in der Lage ist, die im APS enthaltene Bindungsenergie in biologisch verwertbare Energie in Form von Adenylaten umzuwandeln.
Kinetische Untersuchungen zeigten die hohen Substrataffinitäten der ATP - Sulfurylase auf (K_m für APS: 0.0709 mM; K_m für PP_i 0.0174 mM), die in der Lage ist, mit der ADP - Sulfurylase (K_m für APS: 0.28 mM) und der Pyrophosphatase (K_m für PP_i: 0.205 mM) erfolgreich um die gemeinsamen Substrate zu konkurrieren.
Die untersuchten Enzyme lagen im partiell gereinigten Zustand vor und waren frei von Fremdaktivitäten, die die Aufnahme der Substratsättigungskurven hätten beeinflussen können.
Durch die ATP - Sulfurylase wird eine sinnvolle und energiebringende Verknüpfung zwischen der Syntheseleistung der Zelle und dem Schwefelmetabolismus hergestellt. Durch die Erschließung der im PP_i enthaltenen Bindungsenergie wird über die ATP-Sulfurylase im Zuge der Substratphosphorylierung die doppelte Energiemenge erzeugt wie über die enzymatische Reaktionsfolge APS - Reduktase ⟶ ADP - Sulfurylase ⟶ Adenylatkinase.
ADP - und ATP - Sulfurylase sind konstitutiv in vergleichbaren Aktivitäten in der Zelle vorhanden. Die Ausprägung der spezifischen Aktivitäten beider Enzyme ist abhängig von der jeweiligen Wachstumsphase und steht in Korrelation zum APS-erzeugenden Enzym.
Die Zelle selbst bestimmt durch ihre Syntheseleistungen den Umfang, in welchem ADP - Sulfurylase und ATP - Sulfurylase an der Umwandlung des APS beteiligt sind.

2. Chromatium warmingii verfügt wie Thiobacillus denitrificans über die gleichen enzymatischen Möglichkeiten des Energiege-

winns durch Substratphosphorylierung . Auch in diesem Organismus verfügt die ATP - Sulfurylase über günstigere Affinitäten zu ihren Substraten (K_m für APS: 0.0639 mM; K_m für PP_i: 0.0083 mM) wie die Konkurrenzenzyme ADP - Sulfurylase (K_m für APS: 0.392 mM) und Pyrophosphatase (K_m für PP_i: 0.147 mM). Die Ausprägung der spezifischen Aktivitäten von APS - Reduktase, ADP - Sulfurylase und ATP - Sulfurylase ist abhängig von der jeweiligen Wachstumsphase.

3. Bei den untersuchten Vertretern der kleineren Chromatiaceae konnte lediglich bei Chromatium vinosum und Chromatium minutissimum unter photolithoautotrophen Wachstumsbedingungen eine (membrangebundene) APS - Reduktase nachgewiesen werden.
In C.purpuratum konnte dieses Schlüsselenzym der Substratphosphorylierung ebensowenig nachgewiesen werden wie die ADP - Sulfurylase.
C.gracile verfügt zwar über eine ADP - Sulfurylase, die sich in ihren physikalischen und biochemischen Leistungen und Eigenschaften kaum von denen der anderen bearbeiteten ADP - Sulfurylasen unterscheidet, der Nachweis einer APS - Reduktase konnte jedoch nicht erbracht werden.

4. Die APS - Reduktase aus C.vinosum konnte durch den Aufschluß zu einem geringen Prozentsatz in ihrer aktiven Form aus dem Membranverband herausgelöst und angereichert werden. Das Enzym hatte ein Molekulargewicht von 185 000, das pH - Optimum lag bei 8.2 ($K_3Fe(CN)_6$ als Elektronenakzeptor) bzw. bei 7.6 (Cytochrom c als Elektronenakzeptor). Als Elektronenakzeptoren konnten neben Kaliumhexacyanoferrat und Cytochrom c aus Candida crusei die aus Chromatium gracile gereinigten löslichen Cytochrome eingesetzt werden. Das Temperaturoptimum der Reaktion lag bei 42°C; nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei 68°C verlor die APS - Reduktase ihre katalytischen Fähigkeiten. Im solubilisierten Zustand verlor das Enzym nach

einer Lagerungsperiode von 9 h auf Eis 50% seiner Ausgangsaktivität. Mit Ausnahme von cAMP konnten alle getesteten Mononukleotide von der APS - Reduktase als Substrat verwertet werden; die höchsten Aktivitäten wurden jedoch mit AMP erzielt. Sulfhydrylgruppenhemmstoffe und Schwermetallionen zeigten ausgeprägt hemmende Wirkung.
Diente Cytochrom c aus Candida crusei als Elektronenakzeptor, zeigte das Enzym höhere Substrataffinitäten als im Ferricyanid-gekoppelten Testsystem (K_m-Wert für Sulfit: 49.5 µM resp. 128 µM; K_m-Wert für AMP: 76.9 µM resp. 133 µM).
Das Spektrum der APS - Reduktase aus C.vinosum weist auf das Vorkommen einer Hämkomponente hin. Da aber das Enzympräparat nicht als homogene Einheit vorlag, könnte es sich bei dem Cytochromanteil auch um eine Verunreinigung handeln.

5. Einen zusätzlichen Energiegewinn durch Substratphosphorylierung vermögen die kleineren Vertreter der Chromatiaceae (wenn überhapt) nur über die enzymatische Erschließung des APS über die ADP - Sulfurylase zu erzielen, da sie nicht über eine dissimilatorische ATP - Sulfurylase verfügen.

6. Alle untersuchten Chromatiaceae verfügten neben oder statt der APS - Reduktase mit der Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase über ein weiteres sulfitoxidierendes Enzym, welches das auftretende Sulfit direkt in Sulfat ohne zusätzlichen Energiegewinn umwandelt.
Bei der aus C.gracile angereicherten Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase ließ sich die Vermutung nicht bestätigen, daß es sich bei dem sulfitoxidierenden Enzym um ein (lösliches) Cytochrom handelt. Das Enzym zeigt jedoch geringe spezifische Aktivitäten, wenn das native Cytochrom c' als Elektronenakzeptor fungiert.
Das Molekulargewicht der aus C.vinosum isolierten Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase liegt mit 68 000 deutlich unter dem Molekulargewicht der APS - Reduktase des gleichen Organismus. Das pH - Optimum der Reaktion lag im Cytochrom c - gekoppelten

Test bei 9.2 (8.6 im Ferricyanid-gekoppelten Test). Die Substrataffinitäten für Sulfit und $K_3Fe(CN)_6$ lagen mit 0.377 mM und 0.491 mM deutlich über denen der APS - Reduktase des gleichen Organismus.

7. Bei den aus C.gracile isolierten löslichen Cytochromen handelte es sich um ein Cytochrom c', ein Flavocytochrom und ein Cytochrom c_{553}.
Das Cytochrom c_{553} hatte nach erfolgter Reinigung bis zur Homogenität einen PI von 0.289 . In der Gelelektrophorese konnte ein R_f-Wert von 0.494 ermittelt werden. Das Cytochrom wurde im reduzierten Zustand isoliert, hatte ein Molekulargewicht von 30 000 und verfügt über ein Redoxpotential von 293 mV. Wie bei den anderen beiden Cytochromen konnte durch ein alkalisches Pyridinspektrum gezeigt werden, daß es sich um ein Cytochrom vom c-Typ handelt.

   Das Flavocytochrom konnte bis zur Homogenität gereinigt werden, wies eine R_f-Wert von 0.414 auf und verfügte über ein Molekulargewicht von 68 000. Das Mittelpunktpotential lag bei -21.6 mV.

   Cytochrom c' konnte nicht homogen dargestellt werden, es verfügte nach erfolgter Anreicherung über einen PI von 0.583; der R_f-Wert konnte durch die Gelelektrophorese mit 0.946 angegeben werden. Für das Molekulargewicht wurde ein Wert von 15 000 ermittelt. Das Mittelpunktpotential von Cytochrom c' liegt um den Neutralpunkt.

LITERATURVERZEICHNIS

Abd-el-Malek, Y.- Rizk, S.G. : Culture of Desulphovibrio desulphuricans.
Nature 185, 635 - 636 (1960)

Abd-el-Malek, Y.- Rizk, S.G. : Bacterial sulphate reduction and the development of alkalinity. III. Experiments under natural conditions in the Wadi Natrun.
J.appl.Bact. 26, 20 - 26 (1963)

Adachi, K. - Suzuki, I. : A study of the reaction mechanism of adenosine 5' - phosphosulfate reductase from Thiobacillus thioparus , an iron - sulfur - flavoprotein.
Can.J.Biochem. 55, 91 - 98 (1977)

Adair, F.W. : Membrane - associated sulfur oxidation by the autotrophic Thiobacillus thiooxidans.
J.Bacteriol. 92, 899 - 904 (1966)

Adams, C.A. - Nicholas, D.J.D. : Adenosine 5' - pyrophosphate sulfurylase in baker's yeast.
Biochem.J. 128, 647 - 654 (1972)

Akagi, J.M. - Campbell, L.L. : Studies on thermophilic sulfate reducing bacteria. III. Adenosine - triphosphate - sulphurylase of Clostridium nigrificans and Desulfovibrio desulfuricans.
J.Bacteriol. 84, 1194 - 1201 (1962)

Akagi, J.M. - Campbell, L.L. : Inorganic pyrophosphatase of Desulfovibrio desulfuricans.
J.Bacteriol. 86, 563 - 568 (1963)

Aminuddin, M - Nicholas, D.J.D. : Electron transfer during sulphide and sulphite oxidation in Thiobacillus deni-

trificans.
J.Microbiol. 82, 115 - 123 (1974)

Aminuddin, M : The oxidation of sulfite by adenosine - 5' - phosphosulfate reductase in Thiobacillus denitrificans.
Pertanika 2, 118 - 124 (1979)

Aminuddin, M : Substrate level versus oxidative phosphorylation in the generation of ATP in Thiobacillus denitrificans.
Arch.Microbiol. 128, 19 - 25 (1981)

Arrigoni, O : The enzymatic oxidation of sulphite in mitochondrial preparations of pea internodes.
J.Biochem. 8, 181 - 186 (1959)

Baalsrud, K - Baalsrud, K.S. : The role of phosphate in CO_2 - assimilation of Thiobacilli. In: Symposium on phosperous metabolism, Vol. 2, Mc Elroy, W.D. and Glass, B. (eds), John Hopkins University Press, Baltimore, 544 - 576 (1952)

Baalsrud, K - Baalsrud, K.S. : Studies on Thiobacillus denitrificans.
Arch.Microbiol. 20, 34 - 62 (1954)

Baldensperger,J - Garcia,J. - L. : Reduction of inorganic nitrogen compounds by a new strain of Thiobacillus denitrificans.
Arch.Microbiol. 103, 36 - 39 (1975)

Baltscheffsky, M - Baltscheffsky, H - v. Stedingk, L.V. : Light induced energy conversation and the inorganic pyrophosphatase reaction in chromatophores from Rhodospirillum rubrum.
Brookhaven Symp. Biol. : 19, 246 - 253 (1966)

Baltscheffsky, H - v.Stedingk, L.V. - Heldt, H.W. - Klingenberg, M. : Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation.
Science 153, 1120 - 1122 (1966)

Baltscheffsky, M. : Inorganic pyrophosphate as an energy donor in photosynthetic and respiratory electron transport phosphorylation systems.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 28, 270 - 276 (1967)

Bartsch, R.G. : Bacterial cytochromes.
Ann.Rev.Microbiol. 22, 181 - 200 (1968)

Bartsch, R.G. - Meyer, T.E. - Robinson, A.B. : Complex c - type cytochromes with bound flavin.
In: Okunuki, K. , Kamen, M.D. and Sekuzu, I. (eds), Structure and function of cytochromes, University of Tokyo Press, Tokyo 443 - 451 (1968)

Bitchnell, R - Cullis, P.M. - Jarvest, R.L - Lowe, G. : The stereochemical course of nucleotidyl transfer catalyzed by ATP sulfurylase.
J.Biol.Chem. 257, 8922 - 8927 (1982)

Bloch - Frankenthal, L. : The role of magnesium in the hydrolysis of sodium pyrophosphate by inorganic pyrophosphatase.
Biochem.J. 57, 87 - 92 (1954)

Bowen, T.J. - Happold, F.C. - Taylor, B.F. : Studies of adenosine - 5' - phosphosulfate reductase from Thiobacillus denitrificans.
Biochim.Biophys.Acta 118, 566 - 576 (1966)

Bramlett, R.N. - Peck, H.D. : Some physical and kinetic properties of APS reductase from Desulfovibrio vulgaris.
J.Biol.Chem. 250, 2979 - 2988 (1975)

Brückenhaus, I. : Sulfitoxidasen bei einigen Arten phototropher Schwefelbakterien.
Diplomarbeit, Universität Bonn (1977)

Buchanan, B.B. : Orthophosphate requirement for the formation of phosphoenolpyruvate from pyruvate by enzyme preparations from photosynthetic bacteria.
J.Bacteriol. 119, 1066 - 1068 (1974)

Burnell, J.N. - Anderson, J.W. : Adenosine 5' -sulphatophosphate kinase aktivity in spinach leaf tissue.
Biochem.J. 134, 565 - 579 (1973)

Burnell, J.N. - Whatley, F.R. : A new, rapid and sensitive assay for adenosine 5' - phosphosulfate (APS) kinase.
Anal.Biochem. 68, 281 - 288 (1975)

Burnell, J.N. - Whatley, F.R. : Regulation of sulfur metabolism in Paracoccus denitrificans.
J.Gen.Microbiol. 118, 73 - 78 (1980)

Cagen, L.M. - Friedman, H.C. : Enzymatic phosphorylation of serin.
J.Biol.Chem. 247,3382 - 3392 (1972)

Charles, A.M. - Suzuki, I. : Purifications and properties of sulfite:cytochrome c oxidoreductase from Thiobacillus novellus.
Biochim.Biophys.Acta 128, 522 - 534 (1966)

Charles, A.M. : Mechanism of thiosulfate oxidation by Thiobacillus intermedius.
Arch.Biochem.Biophys. 129, 124 - 130 (1969)

Cooper, B.P. - Trüper, H.G. : Improved synthesis and rapid isolation of millimole quantities of adenylysulfate.
Z.Naturforsch. 34c, 346 - 349 (1979)

Cooperman, B.S. - Chiu, N.Y. : Yeast inorganic pyrophosphatase. II. Magnetic resonance and steady state kinetic studies of metal ion and pyrophosphate analog binding. Biochemistry 12, 1670 - 1676 (1973)

Cooperman, B.S. - Chiu, N.Y. : Yeast inorganic pyrophosphatase. III. Active site mapping by electrophilic reagents and binding measurements. Biochemistry 12, 1676 - 1682 (1973)

Cusanovich, M.A. - Bartsch, R.G. : A high potential cytochrome c from Chromatium chromatophores. Biochim.Biophys.Acta 189, 245 - 255 (1969)

De Meio, R.M. : Sulfate activation and transfer. in: Methabolic pathways, 3. ed. , VII. Methabolism of sulfur compounds. D.M. Greenberg,(ed.), Academic Press,New York, 287 - 358 (1975)

Dignam, J.D. - Deutscher, M.P. :Aminoacyl - tRNA synthetase stimulatory factors and inorganic pyrophosphatase. Biochemistry 18, 3165 - 3170 (1979)

Drozd, J.W. : Energy conservation in Thiobacillus neapolitanus. c: Sulphide and sulphite oxidation. J.Gen.Microbiol. 98, 309 - 311 (1977)

Dutton, L. : Redox-potentiometery: Determination of midpoint potentials of oxidation - reduction - components of biological electron - transfer - systems. In: Methods in Enzymology, LIV, S.P. Collowick and N.O. Kaplan (eds) Academic Press, New York 411 - 435 (1978)

Evans, H.J. - Wood, H.G. : The mechanism of the pyruvate, phosphate dikinase reaction. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 61, 1448 - 1453 (1968)

Evans, H.J. - Wood, H.G. : Purification and properties of pyruvate, phosphate dikinase from propionic acid bacteria.
Biochemistry 10, 721 - 729 (1971)

Farley, J.R. - Christie, E.A. - Seubert, P.A. - Segel, I.H. : Adenosine triphosphate sulfurylase from Penicillium chrysogenum.
J.Biol.Chem. 254, 3537 - 3542 (1979)

Floodgaard, H. : Isotope derivate method for determination of microquantities of inorganic pyrophosphate in biological material.
Eur.J.Biochem. 15, 273 - 279 (1970)

Fromageot, P - Vaillant, R. - Perez-Milan, H. : Oxidation du sulfite en sulfate par la racine d'avoine.
Biochim.Biophys.Acta 44, 77 - 85 (1960)

Grunberg-Manago, M. - Del Campillo-Campbell, A. - Dandon, L - Michelson, A.M. : ADP - sulfurylase de levure un exchange entr l' orthophosphate et le phosphate terminal des nucleosides diphosphates.
Biochim.Biophys.Acta 123, 1 - 16 (1966)

Guillory, R.J. - Fisher, R.R. : Studies of the light - dependent synthesis of inorganic pyrophosphate by Rhodospirillum rubrum chromatophores.
Biochem.J. 129, 471 - 481 (1972)

Hawes, C.S. - Nicholas, D.J.D. : Adenosine 5' - triphosphate sulfurylase from Saccharomyces cerevisiae.
Biochem.J. : 133, 541 - 550 (1973)

Hempfling, W.P. - Trudinger, P.A. : Purification and some properties of sulfite oxidase from Thiobacillus neapolitanus.
Arch.Microbiol. 59, 149 - 157 (1967)

Horn, A - Börnig, H - Thiele, G. : Allosteric properties of the Mg^{2+} dependent inorganic pyrophosphatase in mouse liver cytoplasm.
Eur.J.Biochem. 2, 243 - 249 (1967)

Hörder, M : Inorganic pyrophosphate - phosphohydrolytic activity in human serum. Catalytic properties of the ionic species of PP_i and $MgPP_i$ complexes.
Biochim.Biophys.Acta 321, 329 - 335 (1973)

Hörder, M. : Complex formation of inorganic pyrophosphate with magnesium. The influence of ionic strength, supporting medium and temperature.
Biochim.Biophys.Acta 358, 319 - 328 (1974)

Howard, A - Lundgren, D.G. : Inorganic pyrophosphatase from Ferrobacillus ferrooxidans (Thiobacillus ferrooxidans).
Can.J.Biochem. 48, 1302 - 1307 (1970)

Imhoff, J.F. : Phototrophe Bakterien salzhaltiger Standorte: Ökologische und taxonomische Aspekte.
Diplomarbeit, Universität Bonn (1976)

Imhoff, J.F. : Aspekte des assimilatorischen Schwefelstoffwechsels. Dissertation, Universität Bonn (1980).

Imhoff, J.F. : Occurence and evolutionary significance of two sulfate assimilatory pathways in the Rhodospirillaceae.
Arch.Microbiol. 132, 197 - 203 (1982)

Jaworek, D. - Gruber, W. - Bergmeyer, H.U. : Adenosin 5' - diphosphat und Adenosin 5' - monophosphat.
in: Methoden der enzymatischen Analyse. Band II
H.U. Bergmeyer (ed), Verlag Chemie Weinheim 2051 - 2054 (1970)

Johnson, J.L. - Rajagopalan, K.V. : The oxidation of sulfite in animal tissues. in: Excerpta Medica. Sulfur in biology (Ciba foundation symposium 72) 119 - 133 (1980)

Johnson, J.L. : Rat liver 'cytochrome b_9' is sulfite oxidase. J.Biol.Chem. 256, 9824 - 9825 (1981)

Josse, J. : Constitutive inorganic pyrophosphatase of Escherichia coli. J.Biol.Chem. 241, 1938 - 1957 (1966)

Kämpf, C. - Pfennig, N.: Capacity of Chromatiaceae for chemotrophic growth. Specific respiration rates of Thiocystis violacea and Chromatium vinosum. Arch.Microbiol. 127, 125 - 135 (1980)

Keister, D.L. - Yike, N.J. : Energy linked reactions in photosynthetic bacteria. II. The energy - dependent reactions of oxidized nicotinamide - adenine - dinucleotide phosphate by reduced nicotinamide - adenine - dinucleotide in chromatophores of Rhodospirillum rubrum. Biochemistry 6, 3847 - 3857 (1967)

Kelley, B.C. - Tuovinen, O.H. - Nicholas, D.J.D. : Utilization of ^{35}S thiosulfate and an appraisal of the role of ATP sulfurylase in chemolithotrophic Thiobacillus ferrooxidans. Arch.Microbiol. 109, 205 - 209 (1976)

Kessler, D.L. - Rajagopalan, K.V. : Purification and properties of sulfite oxidase from chicken liver. J.Biol.Chem. 247, 6566 - 6573 (1972)

Khandelwal, R.L. : The regulation of liver phosphoprotein phosphatase by inorganic pyrophosphate and cobalt. Arch.Biochem.Biophys. 191, 764 - 773 (1978)

Khandelwal, R.L. - Kamanei, S.A.S. : Studies on inactivation and reactivation of homogenous rabbit liver phosphoprotein phosphatase by inorganic pyrophosphate and divalent cations.
Biochim.Biophys.Acta 613, 95 - 105 (1980)

Khanna, S. - Nicholas, D.J.D. : Substrate phosphorylation in Chlorobium vibrioforme f.sp.thiosulphatophilum.
J.Gen.Microbiol. 129, 1365 - 1370 (1983)

Kirchhoff,J. - Trüper, H.G. : Adenylylsulfate reductase of Chlorobium limicola.
Arch.Microbiol. 100, 115 - 120 (1974)

Klemme, J.H. - Klemme, B. - Gest, H. : Catalytic properties and regulatory diversity of inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria.
J.Bacteriol. 108, 1122 - 1128 (1971)

Klemme, J.H. - Gest, H. : Regulation of the cytoplasmic pyrophosphatase of Rhodospirillum rubrum.
Eur.J.Biochem. 22, 529 - 537 (1971)

Klemme, J.H. : Regulation of intracellular pyrophosphatase - activity and conservation of the phosphoanhydride - energy of inorganic pyrophosphate in microbial metabolism.
Z.Naturforsch. 31c, 544 - 550 (1976)

Kleppe, K. : Aspartate transcarbamylase from Escherichia coli. I. Inhibition by inorganic ions.
Biochim.Biophys.Acta 122, 450 - 461 (1966)

Kodoma, A. : Studies on the metabolism of a sulfur oxidizing bacterium. VI. Fractionation and reconstitution of the elementary sulfur - oxidizing system of Thiobacillus thiooxidans.
Plant & Cell Physiol. 10, 645 - 655 (1969)

Kodoma, A. - Kodoma, T. - Mori, T. : Studies on the metabolism of a sulfur oxidizing bacterium. VII. Oxidation of sulfite by a cell - free extract of Thiobacillus thiooxidans.
Ibid 11, 701 - 711 (1970)

Kondrashin, A.A. - Remenikov, V.G. - Samuilov, V.D. - Skulachev, V.P. : Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Inorganic pyrophosphatase.
Eur.J.Biochem. 113, 219 - 222 (1980)

Kornberg, A. : On the metabolic significance of phosphorolytic and pyrophosphorolytic reactions.
in: Horizons in biochemistry, H. Kasha and B. Pullman (eds), Academic Press, Inc. , New York 251 - 264 (1962)

Krasilnikova, E.N. : Dark anaerobic metabolism of Thiocapsa roseopersicina.
Mikrobiologiya 45, 372 - 374 (1976)

Kunitz, M. : Crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from baker's yeast.
J.Gen.Physiol. 35, 423 - 450 (1952)

Lahti, R. - Heinonen, J. : Reversible changes in the activity of inorganic pyrophosphatase of Streptococcus faecalis. The effect of compounds containing SH groups.
Acta Chem. Scand.Ser.B 35, 33 - 38 (1981)

Lahti, R. - Maunuksela, E. : Comparative studies on bacterial inorganic pyrophosphatases. Stabilities at 37° in the presence and absence of L - Cysteine.
Biochem.Int. 3, 629 - 637 (1981)

Lahti,R. - Heinonen, J. : Activity changes of inorganic pyro-

phosphatase of Streptococcus faecalis during batch culture.
J.Gen.Microbiol. 125, 185 - 188 (1981)

Lahti, R. - Suonpää, M. : Role of gluthatione in the regulation of inorganic pyrophosphatase activity in Streptococcus faecalis.
J.Gen.Microbiol. 128, 1023 - 1026 (1982)

Lahti, R. : Microbial inorganic pyrophosphatases.
Microbiol. Rev. 47, 169 - 179 (1983)

Lapage, S.P. - Skelton, J.E. - Mitchell, T.G. : Media for the maintenance and preservation of bacteria.
in: Methods in Microbiology, Vol. III A, J.R. Norris and D.W. Ribbons (eds), Academic Press London, New York 120 (1970)

Levi, A.S. - Wolf, G. : Purifications and properties of the enzyme ATP sulfurylase and its relation to vitamin A.
Biochim.Biophys.Acta 178, 262 - 282 (1969)

Leyendecker, W. : Charakterisierung der partikelgebundenen APS - Reduktase aus Chromatium warmingii Stamm 6512.
Diplomarbeit, Universität Bonn (1983)

Liu, C.L. - Peck, H.D. : Comparative bioenergetics of sulfate reduction in Desulfovibrio and Desulfotomaculum spp. .
J.Bacteriol. 145, 966 - 973 (1981)

Lochmüller, H. - Wood, H.G. Davis. J.J. : Phosphoenolpyruvate - carboxytransphosphorylase. II. Christallization and properties.
J.Biol.Chem. 241, 5678 - 5691 (1966)

Lowry, O.H. - Rosebrough, N.J. - Farr, A.L. - Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265 - 275 (1951)

Lyric, R.M. - Suzuki, I. : Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by Thiobacillus thioparus.
a: Survey of enzymes and properties of sulfite:cytochrome c oxidoreductase.
Can.J.Biochem. 48, 334 - 343 (1970)
b: Properties of APS reductase
Can.J.Biochem. 48, 344 - 354 (1970)
c: Properties of thiosulfate - oxidizing enzyme and proposed pathway of thiosulfate oxidation.
Can.J.Biochem. 48, 355 - 363 (1970)

MacLeod, R.M. - Farkas, W. - Fridovich,I. -Handler, P. : Purification and properties of hepatic sulfite oxidase.
J.Biol.Chem. 236, 338 - 347 (1961)

McLaughlin, J. - Lindmark, D.G. - Müller, M. : Inorganic pyrophosphatase and nucleotide diphosphatase in the parasitic protozoon, Entamoeba histolytica.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 82, 913 - 920 (1978)

Maurer, H.R. : Disk - Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid - Elektrophorese.
De Gruyter, Berlin (1968)

Maurer, H.R. : Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamid gel electrophoresis.
2nd Edition, De Gruyter, Berlin, New York (1971)

Menon, V.K.N. - Varma, A.K. : Adenosine 5' - triphosphate sulfurylase from Spirulina platensis.
Experimentia 35, 854 - 855 (1979)

Meyer, T.E. - Kennel, S.J. - Tedro, S.M. - Kamen, M.D. : Iron protein content of Thiocapsa pfennigii, a purple sulfur bacterium of atypical chlorophyll composition.
Biochim.Biophys.Acta 292, 634 - 643 (1973)

Michaels, G.B. - Davidson, J.T. - Peck, H.D. : A flavin - sulfite adduct as an intermediate in the reaction catalyzed by adenylyl sulfate reductase from Desulfovibrio vulgaris.
Biochim.Biophys.Res.Commun. 39, 321 - 328 (1970)

Moriarty, D.J.W. : Inorganic sulfur compound oxidation in Thiobacillus concretivorus.
Ph.D thesis, University of Adelaide (1969)

Moriarty, D.J.W. - Nicholas, D.J.D. : Enzymic sulphide oxidation by Thiobacillus concretivorus.
Biochim.Biophys.Acta 184, 114 - 123 (1969)

Moriarty, D.J.W. - Nicholas, D.J.D. : Electron transfer during sulphide and sulphite oxidation by Thiobacillus concretivorus.
Biochim.Biophys.Acta 216, 130 - 138 (1970)

Nickerson, W.J. - Strauss, P.W.: The photochemical cleavage of water by riboflavin.
J.Americ.Chem.Soc. 82, 5007 - 5008 (1960)

Nishikawa, K. - Hosei, K. Suzuki, I. - Yoshimura, S. - Horio, T. : Formation and decomposition of pyrophosphate related to bacterial photophosphorylation.
J.Biochem. 73, 537 - 553 (1973)

O'Brien, W.E. - Bowien, S. - Wood, H.G. : Isolation and characterization of a pyrophosphate - dependent phosphofructokinase from Propionibacterium shermanii.
J.Biol.Chem. 250, 8690 - 8695 (1975)

Onajobi, F.D. - Cole, C.V. - Ross, C. : Adenosine 5' - triphosphate sulfurylase in corn roots and its partial purification.
Plant Pysiol. 52, 580 - 584 (1973)

Peck, H.D. : Adenosine - 5' - phosphosulfate as an intermediate in the oxidation of thiosulfate by Thiobacillus thioparus.
Proc.Natl.Acad.Sci.US 46, 1053 - 1057 (1960)

Peck, H.D. : Evidence for the reversibility of the reaction catalyzed by adenosine - 5 - phosphosulfate reductase.
Biochim.Biophys.Acta 49, 621 - 624 (1961)

Peck, H.D. : The role of adenosine - 5' - phosphosulfate in the reduction of sulfate to sulfite by Desulfovibrio desulfuricans.
J.Biol.Chem. 237, 198 - 203 (1962)

Peck, H.D. - Stulberg, M.P. : O^{18}- studies on the mechanism of sulfate formation and phosphorylation in extracts of Thiobacillus thioparus.
J.Biol.Chem. 237,1648 - 1652 (1962)

Peck, H.D. - Fisher, E. : The oxidation of thiosulfate and phosphorylation in extracts of Thiobacillus thioparus.
J.Biol.Chem. 237, 190 - 197 (1962)

Peck, H.D. : Symposium on metabolism of inorganic compounds. V. Comparative metabolism of inorganic sulfur compounds in microorganisms.
Bacteriol.Rev. 26, 67 - 94 (1962)

Peck, H.D. - Deacon, T.E. - Davidson, J.T. : Studies of APS reductase from Desulfovibrio desulfuricans and Thiobacillus thioparus.
Biochim.Biophys.Acta 90, 429 - 446 (1965)

Peck, H.D. : Some evolutionary aspects of inorganic sulfur metabolism. in: Lecture series on theoretical and

applied aspects of modern microbiology.
University of Maryland, College Park, 1 - 27 (1966)

Penefsky, H.S. - Tzagoloff, A. : Extraction of water - soluble proteins from membranes. in: Methods in Enzymology, Vol XXII, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds) Academic Press, New York, pp. 204 - 219 (1971)

Petushkova , Y.P. - Ivanovskii, R.N. : Oxidation of sulfite by Thiocapsa roseopersicina.
Microbiologiya, 45, 592 - 597 (1976)

Petushkova, Y.P, - Ivanovskii, R.N. : Enzymes partizipating in thiosulfate metabolism in Thiocapsa roseopersicina during its growth under various conditions.
Microbiologiya 45, 960 - 965 (1976)

Pina, M.Z. - Brunner, A. - Chagoya, V. - Pina, E. : The regulation of myo - inositol - 1 - phosphate - synthase activity from Neurospora crassa by pyrophosphate and some cations.
Biochim.Biophys.Acta 384, 501 - 507 (1975)

Pfennig, N. : Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. in: Anreicherungskulturen und Mutantenauslese. H.G. Schlegel und E. Kröger (eds), G. Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 179 - 189 (1965)

Pfennig, N. - Lippert, K.D. : Über das Vitamin B_{12} - Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.
Arch.Microbiol. 55, 245 - 256 (1966)

Pfennig, N. - Trüper, H.G. : Isolation of members of the families Chromatiaceae and Chlorobiaceae.
in: The Procaryotes. A handbook on habitats, Isolation and identifications of bacteria, Vol. I.

M.P. Starr. H.Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H.G. Schlegel (eds), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 279 - 289 (1982)

Rao, N.A. - Felton, S.P. : Quantitative determinations of mitochondrial flavins.
in: R.W. Estabrook and M.E. Pullman (eds), Methods in Enzymology Vol. X pp. 494 - 499.
Academic Press Inc. New York

Rapoport, T.A. - Höhne, W.E. - Reich, J.G. - Heitmann, P. - Rapoport, S.M. : A kinetic model for the action of the inorganic pyrophosphatase from baker's yeast. The activating influence of magnesium ions.
Eur.J.Biochem. 26,237 - 246 (1972)

Reeves, R.E. : A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase.
J.Biol.Chem. 243,3202 - 3204 (1968)

Reeves, R.E. : Pyruvate, phosphate dikinase from Bacteroides symbiosus.
Biochem.J. 125, 531 - 539 (1971)

Reeves, R.E. - South, D.J. - Blytt, H.J. - Warren, L.G. : Pyrophosphate:D-fructose - 6 - phosphate 1 - phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6 - phosphofructokinase.
J.Biol.Chem. 249,7737 - 7741 (1974)

Reeves, R.E. - Guthrie, J.D. : Acetate kinase (Pyrophosphate) - A fourth pyrophosphate - dependent kinase from Entamoeba histolytica.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 66, 1389 - 1395 (1975)

Reeves, R.E. - Serrano, R. - South, D.J. : 6 - phosphofructokinase (pyrophosphate). Properties of the enzyme

from Entamoeba histolytica and its reaction mechanism.
J.Biol.Chem. 251, 2958 - 2962 (1976)

Robbins, E.A. - Stulberg, M.P. - Boyer, P.D. : The magnesium activation of pyrophosphatase.
Arch.Biochem.Biophys. 54, 215 - 222 (1955)

Robbins, P.W. - Lipmann, F. : Isolation and identification of active sulfate.
J.Biol.Chem. 229, 837 - 851 (1957)

Robbins, P.W. - Lipmann, F. : Separation of the two enzymatic phases in active sulfate synthesis.
J.Biol.Chem. 233, 681 - 685 (1958)

Santer, M. : The role of O^{18} phosphate in thiosulphate oxidation by Thiobacillus thioparus.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 1, 9 - 12 (1959)

Santer, M. - Margulies, M. - Klinmann, N. - Kaback, R. : Role of inorganic phosphate in thiosulphate metabolism by Thiobacillus thioparus.
J.Bacteriol. 79,313 - 320 (1960)

Sawhney, S.K. - Nicholas, D.J.D. : Effects of amino acids, adenine nucleotides and inorganic pyrophosphate on glutamine synthetase from Anabena cylindrica.
Biochim.Biophys.Acta 527, 485 - 496 (1978)

Schedel, M. : Untersuchungen zur anaeroben Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen durch Thiobacillus denitrificans, Chromatium vinosum und Chlorobium limicola.
Dissertation, Universität Bonn (1978)

Schedel, M. - Trüper, H.G. : Purification of Thiobacillus denitrificans siroheme sulfite reductase and investi-

gations of some molecular and catalytic properties. Biochim.Biophys.Acta 568, 454 - 467 (1979)

Schedel, M. - Trüper, H.G. : Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in Thiobacillus denitrificans. Arch.Microbiol. 124, 205 - 210 (1980)

Schug, A. : Anreicherung und Charakterisierung der ADP - Sulfurylase aus Thiobacillus denitrificans. Diplomarbeit, Universität Bonn (1979)

Schwenn, J.D. - Biere, M. : APS reductase activity in the chromatophores of Chromatium vinosum strain D. FEMS Microb. Letters 6, 19 - 22 (1979)

Shadi, A. - Mansurova, S.E. - Tsydendambaev, V.D. - Kulaev, I.S. : Biosynthesis of polyphosphates in chromatophores of Rhodospirillum rubrum. Microbiology 45, 292 - 295 (1975)

Shaw, W.H. - Anderson, J.W. : The enzymology of adenosine triphosphate sulfurylase from spinach leaf tissue. Kinetic studies and proposed reaction mechanism. Biochem.J. 139, 27 - 35 (1974)

Skyring, G.W. - Trudinger, P.A. : A comparison of the electrophoretic properties of the ATP sulfurylase, APS reductase, and sulfite reductase from cultures of dissimilatory sulfate reducing bacteria. Can.J.Microbiol. 19, 375 - 380 (1973)

Starr, R.P. - Oginski, E.L. : Inorganic pyrophosphatase of Streptococcus faecium F 24. Can.J.Microbiol. 18, 183 - 192 (1972)

Steinmetz, M.A. - Fischer, U. : Cytochromes of the non - thiosulfate utilizing green sulfur bacterium Chlorobium limicola.

Arch.Microbiol. 130, 31 - 37 (1981)

Stickland, L.H. : The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction.
J.Gen.Microbiol. 5, 698 - 703 (1951)

Stille, W. : Untersuchungen zur Reduktion von APS bei einigen Stämmen sulfatreduzierender Bakterien.
Diplomarbeit, Universität Bonn (1982)

Stille, W. - Trüper, H.G. : Adenylylsulfate reductase in some new sulfate - reducing bacteria.
Arch.Microbiol. 137, 145 - 150 (1984)

Tager, J.M. - Rautanen, N. : Sulfite oxidation by a plant mitochondrial system. I. Preliminary observations.
Biochim.Biophys.Acta 18, 111 - 121 (1955)

Tatzki, G. : Sulfitoxidierende Enzyme bei Thiocystis violacea Stamm 2311.
Diplomarbeit, Universität Bonn (1979)

Taussky, H.H. - Shorr, E. : A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorous.
J.Biol.Chem 202, 675 - 685 (1953)

Thiele ,H.H. : Wachstumsphysiologische Untersuchungen an Thiorhodaceae; Wasserstoffdonatoren und Sulfatreduktion.
Dissertation, Universität Göttingen (1966)

Thiele, H.H. : Sulfur metabolism in Thiorhodaceae. V. Enzymes of sulfur metabolism in Thiocapsa floridana and Chromatium species.
Antonie v. Leeuwenhoek 34, 350 - 356 (1968)

Toghrol, F. - Southerland, W.M. : Purification of Thiobacillus

novellus sulfite oxidase.
J.Biol.Chem. 258, 6762 - 6766 (1983)

Tominaga, N. - Mori, T. : Purification and properties of inorganic pyrophosphatase from Thiobacillus thiooxidans.
J.Biochem. 81, 477 - 483 (1977)

Tomiyama,Y. - Doi, M. Takamiya, K. - Nishimura, M. : Isolation, purification and some properties of cytochrome c_{551} from Chromatium vinosum.
Plant & Cell Pysiol. 24, 11 - 16 (1983)

Trüper, H.G. - Pfennig, N. : Sulfur metabolism in Thiorhodaceae. III. Storage and turnover of thiosulphate sulphur in Thiocapsa floridana and Chromatium species.
Antonie v. Leewenhoek 32, 261 - 276 (1966)

Trüper, H.G. - Peck, H.D. : Formation of adenylyl sulfate in phototrophic bacteria.
Arch.Microbiol. 73, 125 - 142 (1970)

Trüper, H.G. : Adenylylsulfat - Reduktasen in phototrophen Bakterien.
Habilitationsschrift, Universität Göttingen (1971)

Trüper, H.G. - Rogers, L.A. : Purification and properties of adenylyl sulfate reductase from the phototrophic bacterium Thiocapsa roseopersicina.
J.Bacteriol. 108, 1112 - 1121 (1971)

Trüper, H.G. : The enzymology of sulfur metabolism in phototrophic bacteria.
Plant & Soil 43, 29 - 39 (1975)

Trüper, H.G. - Fischer, U. : Anaerobic oxidation of sulphur compounds as electron donors for bacterial photosynthesis.
Phil.Trans.R.Soc.Lond.B 298, 529 - 542 (1982)

Trüper, H.G. - Pfennig, N. : Characterization and identification of the anoxigenic phototrophic bacteria. in: The Procaryotes. A Handbook of Habitats , Isolation and Idenitification of Bacteria, Vol. I. M.P. Starr, H.Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H.G. Schlegel (eds) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 299 - 311 (1982)

Tuovinen, O.H. - Kelley, B.C. - Nicholas, D.J.D. : Enzymatic comparisons of the inorganic sulphur metabolism in autotrophic and heterotrophic Thiobacillus ferrooxidans.
Can.J.Microbiol. 22, 109 - 113 (1976)

Van Niel, C.B. : On the morphology and physiology of the purple and green sulphur bacteria.
Arch.Microbiol. 3, 1 - 112 (1931)

Van Niel, C.B. : Techniques for the enrichment, isolation and maintenance of the photosnthetic bacteria.
in : Methods in Enzymology. Vol. XXIII, Part A. S.P. Colowick, N.O. Kaplan (eds), Academic Press, New York, pp. 3 - 28 (1971)

Vestal, J.R. - Lundgren,D.G. : The sulfite oxidase of Thiobacillus ferrooxidans (Ferrobacillus ferrooxidans).
Can.J.Biochem. 49, 1125 - 1130 (1971)

Vogler, K.G. : Studies on the metabolism of autotrophic bacteria. II. The nature of the chemosynthetic reactions.
J.Gen.Physiol. 26, 103 - 117 (1942)

Vogler, K.G. - Umbreit, W.W. : Studies on the metabolism of autotrophic bacteria. III . The nature of the energy storage material active in the chemosynthetic process.
J.Gen.Physiol. 26, 157 - 167 (1943)

Warburg, O. - Christian, N. : Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase.
Biochem.Z. 310, 348 - 421 (1941)

Wermter, U. : Elektronentransportproteine aus Chromatium warmingii.
Diplomarbeit, Universität Bonn (1983)

Wheeler, T.J. - Lowenstein, J.M. : Effects of pyrophosphate, triphosphate and potassium chloride on adenylate deaminase from rat muscle.
Biochemistry 19, 4564 - 4567 (1980)

Wilson, L.G. - Bandurski, R.S. : Enzymatic reactions involving sulfate, sulfite, selenate and molybdate.
J.Biol.Chem. : 233, 975 - 981 (1958)

Wood, H.G. - Davies, J.J. - Lochmüller, H : The equilibria of reactions catalyzed by carboxytransphosphorylase, carboxykinase and the synthesis of phosphoenolpyruvate.
J.Biol.Chem. 241, 5692 - 5704 (1966)

Wood, H.G. - O'Brien, W.E. - Michaels, G. : Properties of carboxytransphosphorylase; phosphate dikinase; pyrophosphate - acetate kinase and their roles in the metabolism of inorganic pyrophosphate.
Adv.Enzymol. 45, 85 - 155 (1977)

Selbst einem Edlen fällt es schwer, sich aller Wohltaten gegenüber sichtlich dankbar zu erweisen

Malcolm McGuire in
-Out of the dark-

Ich habe meinem Doktorvater Prof. Trüper für die Überlassung des Arbeitsplatzes und eines interessanten Themas, für viele wertvolle Denkanstöße und für die Aufnahme in ein phantastisches Arbeitsteam zu danken.

Herrn Prof. Höfer bin ich sehr dankbar für die wirklich freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Klemme danke ich besonders herzlich für wertvolle Literaturhinweise zur anorganischen Pyrophosphatase.

Allen Mitarbeitern des Hauses, insbesondere meinen Kolleginnen und Kollegen des Turmlabors, habe ich für viele interessante Gespräche (die nicht immer fachbezogen waren) zu danken.
Ich kann mich vieler Situationen erinnern, in denen mir diese Gespräche viel Licht in den tristen Laboralltag brachten.

Den Doktoren Steinmetz und Fischer gebührt mein Dank für zahlreiche Ratschläge zur Bearbeitung der Cytochrome.

Allen genannten und ungenannten Personen gilt mein aufrichtiger Dank für die mir zuteil gewordene mannigfaltige Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Horst Ulbricht
Geburtsdatum	30.03.1953
Geburtsort	Essen

Bildungsweg:

Volksschule	1959 - 1966 in Barnstorf (Niedersachsen)
Aufbauschule	1966 - 1969 in Bruchhausen - Vilsen (Niedersachsen)
Gymnasium	1969 - 1973 in Diepholz (Niedersachsen)
Studium	1975 - 1984 an der Rheinischen Friedrich - Wilhelms-Universität zu Bonn im Fachbereich Biologie
Prüfungen	1978 Vordiplom 1981 Diplom 1984 Promotion
Diplomarbeit	Experimentelle Arbeit im Fach Mikrobiologie unter der Leitung des Institusdirektors Prof. Dr. Trüper
Dissertation	Im gleichen Hause und unter gleicher Leitung.
Innegehabte Positionen	Wissenschaftliche Hilfskraft (01.10.1979 - 31.03.81 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (1.6.1981 - 31.12.83